

Analytik und Synthese von Pyrrol-Schwefelverbindungen der Gattung *Allium* sowie deren Verwen- dung in der Biosensorik

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

M.Sc. Fabian Alexander Rüger

aus (Heilbronn -)Neckargartach

Marburg Lahn, Jahr 2020

1. Gutachter:

Prof. Dr. Michael Keusgen

2. Gutachter:

Prof. Dr. Frank Runkel

vorgelegt am:

17.03.2020

Tag der mündlichen

28.04.2020

Prüfung

Hochschulkennziffer

1180

Danksagung

Ich möchte hiermit all jenen danken, die mich während dieser Promotionsarbeit begleitet und unterstützt haben.

Ganz besonders möchte ich Herrn Prof. Dr. Keusgen danken, der diese Arbeit erst möglich gemacht und betreut hat. Meinen Dank auch für die von ihm auf Expeditionen gesammelten *Allium*-Proben, die Unterstützung mit Spektren sowie für die Korrektur der Arbeit. Mein Dank gilt auch besonders Doru Vornicescu, mit dem ich während der Zeit viele kurzweilige Gespräche führen konnte und der meinen wissenschaftlichen Horizont erweiterte.

Mein Dank gilt dem gesamten Arbeitskreis Keusgen für die schöne Zeit, Dr. R. Fritsch vom IPK Gatersleben für die Bereitstellung von verschiedensten *Allium*-Proben, Prof. Dr. A. Heine für die Auswertung der Kristallstrukturen, C. Sohn für die Vorbereitung der Proben für die Kristallographie, N. Zitzer für die Bearbeitung der aufgegebenen Massen, sowie dem gesamten Team der NMR-Abteilung.

Natürlich danke ich auch im Besonderen meinen Eltern, sowie meiner Freundin, die mir während meines Studiums und meiner Promotion jederzeit zur Seite standen.

Danken möchte ich auch dem gesamten Arbeitskreis-Keusgen für die anregenden Diskussionen und die schöne Zeit während der Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	X
Abbildungsverzeichnis und Schemata	XII
1 Einleitung	17
1.1 Die Gattung <i>Allium</i>	17
1.2 Die Untergattung <i>Melanocrommyum</i>	19
1.3 Schwefelverbindungen, Allinasereaktion und Sekundärmetabolite	20
1.4 Porphyrine.....	26
1.5 Pyrrolverbindungen in der Natur	29
1.6 Organische Thiocyanate.....	31
1.7 Methoden zur Synthese.....	34
1.7.1 Bipyrrrole und Dithiine	38
1.8 Natürliche Polysaccharide	40
1.9 HPLC-Analytik	45
1.10 SPR Analytik	47
1.11 Oberflächenentwicklung für die SPR-Analytik und Biosensorik.....	50
1.12 Zielsetzung der Arbeit.....	53
2 Material und Methoden	54
2.1 Pflanzenproben	54
2.2 Probenvorbereitung und Alliinasereaktion	55
2.2.1 Probenvorbereitung.....	55
2.2.2 Alliinasereaktion.....	55
2.3 Probenextraktion	56
2.3.1 Herstellung methanolischer Extrakte für die Analyse von stark polaren Verbindungen	56
2.3.1 Herstellung isopropanolischer Extrakte für die Analyse des roten Farbstoffes	57
2.4 Herstellung der verwendeten Puffer und Reagenzien.....	57
Chemikalien und Lösungsmittel	57
2.4.1 Boratpuffer pH 9,5.....	58
2.4.2 Herstellung des OPA Derivatisierungsreagenzes	58
2.4.3 Herstellung einer 1-M Iodacetamidlösung	58
2.4.4 Herstellung des Phosphatpuffers pH 6,5	58
2.4.5 HPLC-MS-Puffer.....	59

2.4.5	SPR-Puffer und Reagenzien	59
2.5	Derivatisierung mittels OPA-Reagenz.....	60
2.7	Dünnschichtchromatographie	61
2.8	Ionenaustauschchromatographie.....	61
2.9	Präparative Säulenchromatographie (offene Säule).....	61
2.10	HPLC-Gradienten und Methoden	62
2.10.1	Verwendete HPLC-Systeme:	62
2.10.2	Verwendete HPLC-Gradienten:	63
2.11	Reinigung der SPR-Chips	64
2.12	SPR Messungen	64
2.13	Elektropolymerisation der Pyrrole auf SPR-Chips	65
2.14	Synthesestrategien zur Darstellung des roten Farbstoffes	66
3	Experimentaltteil	68
3.1	Synthese von Pyrrolverbindungen	68
	Synthese von N-Tosylpyrrol (111)	68
	Synthese von N-Benzylpyrrol (118)	69
	Synthese von N-Triisopropylsilylpyrrol (Tipspyrrol) (120)	71
	Synthese von 2,3-Dimethylpyrrol (123)	72
3.2	Synthese von thiocyanierten und halogenierten Aromaten.....	74
	2-Thiocyanato-tipspyrrol (125).....	74
	3-Brom-tipspyrrol (126).....	76
	3-Thiocyanatoindol (93)	77
	Indol-3- <i>O</i> -methyl-carbonimidothioat (127).....	79
	Synthese von N-(3-Chlorphenyl)-2-thiocyanatopyrrol (129)	80
	Synthese von 2-Thiocyanatopyrrol (69)	81
	Synthese von N-Phenyl-2-thiocyanatopyrrol (131)	85
	Synthese von 4,5-Dimethyl-2-thiocyanatopyrrol (132).....	87
	Synthese von 2-Thiocyanatothiophen (133)	88
	Synthese von 3,4-Dibromtipspyrrol (134)	89
3.3	Synthese verschiedener Edukte und Oxidationsmittel.....	91
	Synthese von Butan-2-oxim (121).....	91
	Synthese von 2-Hydroxyimino-diethylmalonat (137)	92
	Synthese von Benzylmercaptan (138)	93
	Synthese von Benzyldisulfid (139).....	94
	Synthese von 3-Chlor-1-iodbenzol (141).....	95
	Synthese von 3-Chlor-PIFA (142)	96
	Synthese von PIFA (144).....	97
3.4	Synthese von Biarylverbindungen	98
	Synthese von 2,2'-Bipyrrol (102)	98
	Synthese von 3,3'-Bitipspyrrol (145)	99
	Synthese von 2,2'-Bithiophen (31)	102
	Synthese von 3,3'-Bithiophen (147)	103

	Synthese von Biindol (148)	104
	Synthese von 5,5'-Dibrom-2,2'-bithiophen (149)	105
3.5	Synthese des roten Farbstoffs	107
	Synthese des roten Farbstoffs (25)	107
3.6	Synthese von Schwefelverbindungen mittels elementarem Schwefel und Schwefelmonochlorid	109
	Synthese von Biindolotetrasulfid (150)	109
	Synthese von Bithiophentetrasulfid (151)	111
	Synthese von Bis-bithiophendisulfid (152)	111
3.7	Verschiedene Umsetzungen von organischen Thiocyanaten	113
	Umsetzung von 2-Thiocyanatothiophen	113
	Umsetzung von N-Phenyl-2-thiocyanatopyrrol	115
	Umsetzung von N-Methyl-2-thiocyanatopyrrol	117
	Umsetzung von 2-Thiocyanatopyrrol	118
3.8	Synthese von N-substituierten Pyrrolen für die Oberflächenmodifikation	119
	6-(1 <i>H</i> -Pyrrol-1-yl)hexansäure (161)	120
	1-Hexadecyl-1 <i>H</i> -pyrrol (162)	121
	1-Octadecyl-1 <i>H</i> -pyrrol (163)	121
	(1 <i>H</i> -Pyrrol-1-yl)-phenol (164)	122
3.9	Synthese von Goldnanopartikeln	123
3.10	Synthese von Thiol- und Carboxymethyl- modifizierten Polysacchariden	124
4	Ergebnisse und Diskussion	126
4.1	Syntheserouten verschiedener Pyrrol- sowie heteroaromatischer Schwefelverbindungen	126
	4.1.1 Syntheseroute zur Darstellung des roten Farbstoffs	137
4.2	Extraktion von schwefelhaltigen Pyrrolverbindungen aus <i>Allium</i> -Proben	140
4.3	Analytik von Organoschwefelverbindungen aus <i>Allium</i> -Spezies	142
	4.3.1 Lyophilisierung von <i>Allium</i> -Zwiebeln	143
	4.3.2 Alliinasereaktion von <i>Allium</i> -Lyophilisat	144
	4.3.3 Kristallisation des roten Farbstoffes aus verschiedenen Lösungsmitteln und Kristallographie	145
	4.3.4 Derivatisierung des roten Farbstoffes mit NBS/ MeI oder IAA	150
	4.3.5 HPLC, HPLC-MS sowie MSMS Analytik von <i>Allium</i> -Extrakten	151
4.4	Synthese von Goldnanopartikeln	158
4.5	SPR-Analytik des roten Farbstoffes	160
4.6	Oberflächen-Modifikationen für die SPR-Analytik	162
	4.6.1 Oberflächenmodifikation mittels Pyrrol-Copolymeren	162
	4.6.2 Oberflächenmodifikation mittels Gold -BSA-Sandwichstrukturen	168

4.6.3	Oberflächenmodifikation Thiol- und Carboxymethyl-modifizierten Polysacchariden (MA-CM)	173
5	Zusammenfassende Diskussion	178
5.1	Reaktionen von Thiocyanaten und Darstellung des roten Farbstoffs	179
5.2	Umsetzung heteroaromatischer Verbindungen mit elementarem Schwefel oder Schwefelmonochlorid	183
5.3	Extraktion und Purifikation von schwefelhaltigen Pyrrolverbindungen	188
5.4	Kristallographische Analysen	190
5.5	Potentielle Funktion des roten Farbstoffs in der Natur und mögliche Anwendungsgebiete	192
5.6	HPLC-Untersuchungen	192
5.7	Entwicklung von Oberflächenstrukturen für die SPR.....	194
5.7.1	Entwicklung von Polypyrrolooberflächen	194
5.7.2	Entwicklung von BSA-Goldnanopartikel-Sandwich-Oberflächen	196
5.7.3	Entwicklung von BSA-Goldnanopartikel-Sandwich-Oberflächen	196
6	Zusammenfassung und Fazit	197
6.1	Zusammenfassung Synthese und Reaktivität von Thiocyanaten und Disulfiden	197
6.1.1	Substitution des roten Farbstoffs	197
6.1.2	Syntheserouten ausgehend von Disulfiden und Thiocyanaten	198
6.1.2	Neuartige Reaktionen von Thiocyanaten.....	201
6.2	Analytik und Extraktion von schwefelhaltigen Verbindungen aus <i>Allium</i> -Spezies	203
6.2.1	Analytik und Extraktion der vermuteten Lactylpyrrolsulfoxid	203
6.2.2	Analytik und Extraktion des roten Farbstoffs	204
6.3	Entwicklung von Oberflächen für die SPR-Biosensorik	205
6.3.1	Entwicklung von Polypyrrol-Oberflächen für die Biosensorik	206
6.3.2	Entwicklung von BSA-AuNP-Oberflächen für die Biosensorik ..	206
6.3.3	Entwicklung von Polysaccharid-Oberflächen für die Biosensorik	206
6.4	Ausblick	207
7	Abstract	208
8	Literaturverzeichnis	213
9	Anhang	223
	Eidesstattliche Erklärung	231
	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
ACN	Acetonitril
ADDL	<i>Amyloid-beta-derived diffusible ligand</i>
ALCAM	<i>Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule</i>
AuNP	Goldnanopartikel
ber.	Berechnet
BSA	bovines Serum-Albumin
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
ber.	berechnet
CH	Cyclohexan
CM	Carboxymethyliert
ConA-Sav	Fusionsprotein aus Concanavalin A und Streptavidin-
CSO	Cysteinsulfoxid
d	Dublett (NMR)
Da	Dalton
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol

EA	Ethylacetat
EDC	N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid Hydrochlorid
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation (<i>Electro-Spray Ionisation</i>)
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt (Energieeinheit: $1\text{eV} = 1,602176487 \cdot 10^{-19} \text{ J}$)
gef.	gefunden
GSH	Glutathion
hcG	humanes Choriongonadotropin
H ₂ O	Wasser
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i>
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
KAc	Kaliumacetat
LOD	<i>Limit Of Detection</i>
MA	Mercaptoanilin mod.
MA CM	Mercaptoanilin mod. sowie carboxymethyliert
max.	maximal
MeOH	Methanol
MEK	Methylethylketon
Min.	Minute/n
mod.	modifiziert
MS	Massenspektrometer
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis

NCS	N-Chlorsuccinimid
NBS	N-Bromsuccinimid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NSCNS	N-Thiocyanatosuccinimid
nm	Nanometer
NPRP	Mit rotem Farbstoff modifizierte Goldnanopartikel
PA	protektives Antigen
PDT	Photodynamische Therapie
PEE	Petrolether
PHCP	6-(1H-Pyrrol-1-yl)hexansäure-Pyrrol-Copolymer
PC ₁₆ P	N-Hexadecylpyrrol-Pyrrol-Copolymer
PPy	Polypyrrol(e)
red.	Reduziert
r.t.	Raumtemperatur
s	<i>strong</i> (Raman)
s	Singulett (NMR)
Std.	Stunde
t	Zeit
t	Triplett (NMR)
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen

w/v	Masse/Volumen
w/w	Masse/Masse
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
λ	Wellenlänge

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kultivierte <i>Allium</i> -Spezies und ihre Verbreitung nach Fritsch und Friesen (2002).	18
Tabelle 2: Verschiedene Polysaccharide und ihre funktionellen Gruppen.....	40
Tabelle 3: Klinische Anwendungen der SPR-Analytik.....	49
Tabelle 4: Taxa und Acc. Nummern der Pflanzenproben.	54
Tabelle 5: Substanzen und deren Hersteller.	57
Tabelle 6: Lösungen und Puffer für die Goldnanopartikel-Herstellung.....	59
Tabelle 7: Verschiedene Puffer und Lösungen für die SPR.....	60
Tabelle 8: HPLC-Stufengradient für die Trennung von OPA-derivatisierten Proben. ..	63
Tabelle 9: Isokratischer HPLC-Gradient für die Trennung von underivatisierten natürlichen Pyrrol-Verbindungen auf Amino-Säulen.	63
Tabelle 10: Ansatz Synthese N-Tosylpyrrol.	68
Tabelle 11: Ansatz Synthese von N-Benzylpyrrol.	69
Tabelle 12: Ansatz Synthese von N-Triisopropylsilylpyrrol.....	71
Tabelle 13: Ansatz Synthese von 2,3-Dimethylpyrrol.	72
Tabelle 14: Ansatz Synthese von 2-Thiocyanato-tipspyrrol.	74
Tabelle 15: Ansatz Synthese 3-Brom-TIPS-pyrrol.	76
Tabelle 16: Ansatz Synthese von 3-Thiocyanatoindol.....	77
Tabelle 17: Ansatz Synthese von Indol-3-O-methyl-carbonimidothioat.	79
Tabelle 18: Ansatz Synthese von N-(3-Chlorphenyl)-2-thiocyanatopyrrol.	80
Tabelle 19: Ansatz Synthese von 2-Thiocyanatopyrrol a	81
Tabelle 20: Ansatz Synthese von 2-Thiocyanatopyrrol b	82
Tabelle 21: Ansatz Synthese von 2-Thiocyanatopyrrol c	82
Tabelle 22: Ansatz Synthese von 2-Thiocyanatopyrrol d	83
Tabelle 23: Ansatz Synthese von N-Phenyl-2-thiocyanatopyrrol.	85
Tabelle 24: Ansatz Synthese von 4,5-Dimethyl-2-thiocyanatopyrrol.	87
Tabelle 25: Ansatz Synthese von 2-Thiocyanatothiophen.	88
Tabelle 26: Ansatz Synthese von 3,4-Dibromtipspyrrol.	89
Tabelle 27: Ansatz Synthese von Butan-2-oxim.	91
Tabelle 28: Ansatz Synthese von 2-Hydroxyimino-diethylmalonat.	92
Tabelle 29: Ansatz Synthese von Benzylmercaptan.....	93
Tabelle 30: Ansatz Synthese von Benzyldisulfid.	94
Tabelle 31: Ansatz Synthese von 3-Chlor-1-iodbenzol.....	95
Tabelle 32: Ansatz Synthese von 3-Chlor-PIFA.	96
Tabelle 33: Ansatz Synthese von PIFA.....	97
Tabelle 34: Ansatz Synthese von 2,2'-Bipyrrol.	98
Tabelle 35: Ansatz Synthese von 3,3'-Bitipspyrrol a	99
Tabelle 36: Ansatz Synthese von 3,3'-Bitipspyrrol b	100
Tabelle 37: Ansatz Synthese von 3,3'-Bitipspyrrol c	101

Tabelle 38: Ansatz Synthese 2,2'-Bithiophen.	102
Tabelle 39: Ansatz Synthese 3,3'-Bithiophen.	103
Tabelle 40: Ansatz Synthese von 3,3'-Biindol.	104
Tabelle 41: Ansatz Synthese 5,5'-Dibrom-2,2'-bithiophen.	105
Tabelle 42: Ansatz Synthese des roten Farbstoffs.	107
Tabelle 43: Übersicht der Ausbeuten des roten Farbstoffes bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen.	109
Tabelle 44: Ansatz Synthese von Biindolotetrasulfid.	109
Tabelle 45: Ansatz Synthese von Bithiophentetrasulfid.	111
Tabelle 46: Ansatz Synthese Bis-bithiophendisulfid.	112
Tabelle 47: Ausbeuten einiger nach obiger Methodik synthetisierter NSP's.	120
Tabelle 48: Carboxymethylierung von Polysacchariden.	124
Tabelle 49: Thiol-Modifikation von Polysacchariden.	125
Tabelle 50: Übersicht der durchschnittlichen Methanolextrakt-Massen verschiedener <i>Allium</i> -Spezies.	141
Tabelle 51: Übersicht der Ausbeuten von rotem Farbstoff verschiedener <i>Allium</i> -Spezies.	141
Tabelle 52: Trockenverluste ausgewählter <i>Allium</i> -Proben.	143
Tabelle 53: Für die Kristallisation eingesetzte Lösungsmittel.	145
Tabelle 54: Größenbestimmung nach <i>Haiss et al.</i> für verschiedene AuNP-Chargen. .	159

Abbildungsverzeichnis und Schemata

Abbildung 1: Übersicht über das Genus <i>Allium</i> .	19
Abbildung 2: Ausgewählte natürlich vorkommende Cysteinsulfoxide.	20
Abbildung 3: Allinase aus <i>Allium sativum</i> (erstellt mit Pymole 2.4, PDB: 2HOX).	22
Abbildung 4: Sekundäre Aromaverbindungen der Gattung <i>Allium</i> .	23
Abbildung 5: Potentielle dimere und tetramere Strukturen des roten Farbstoffs aus <i>Allium</i> Subg. <i>Melanocrommyum</i> .	24
Abbildung 6: Porphyrin und porphyrinbasierende Verbindungen.	27
Abbildung 7: Entwicklung der Effizienz bei der Umwandlung von Sonnenlicht in nutzbare elektrische Energie verschiedener Farbstoffe für Organo-Solarzellen von 1991 - 2012. ^[28]	27
Abbildung 8: Pyrrolhaltige Naturstoffe. ^[35]	29
Abbildung 9: Werbung für Thanite (Insektizid auf Thiocyanatbasis) (Hercules Incorporated. "Advertisement for Hercules Thanite Insecticide." 1944 <i>Hercules Advertisements</i> , 1944. Records of Hercules Incorporated, Volume 1944. Science History Institute. Philadelphia.).	31
Abbildung 10: Applikationen von Thiocyanaten in der organischen Chemie. ^[50,42]	33
Abbildung 11: Verschiedene sulfoxid- und sulfonhaltige Wirkstoffe.	36
Abbildung 12: Verschiedene ausgewählte Polysaccharide (Ferlac Leuc. Quelle: https://ferment9.com/product/abiasa-leuconostoc-messenteroides-vegano ; am 10.10.2019, um 13.23.).	42
Abbildung 13: Vergleich der Molmassen sowie des Verzweigungsgrad der in dieser Arbeit verwendeten Polysaccharide (nicht maßstabsgetreu).	43
Abbildung 14: Darstellung einer Aminophase.	45
Abbildung 15: Abnahme des evaneszenten Feldes in Abhängigkeit zur Entfernung. ...	48
Abbildung 16: Kretschmann SPR Geometrie.	48
Abbildung 17: Generelle Oberflächenstruktur von Polypyrrol modifizierten SPR Chips für die Biosensorik	51
Abbildung 18: Schematische Darstellung der "Sandwich" SPR-Plattform.	52
Abbildung 19: Extraktion des RF aus enzymatisch umgesetztem <i>Allium</i> Material.	56
Abbildung 20: Schematische Darstellung des Copolymers aus Pyrrol und 6-(1 <i>H</i> -Pyrrol-1-yl)hexansäure (PHCP).	65
Abbildung 21: Schwefelhaltige Verbindung nach fraktionierter Kristallisation aus Cyclohexan.	130
Abbildung 22: Farbverlauf für 2-Thiocyanatopyrrol (links) sowie N-Methyl-2-thiocyanatopyrrol (rechts) bei der Umsetzung mit NaOH in Ethanol.	133
Abbildung 23: Hydrolyse- bzw. Disproportionierungsprodukte bei der Umsetzung von Thienyldisulfid mit MeOH/NaOH.	136
Abbildung 24: HRMS-Auswertung der Hydrolyseprodukte von Thienyldisulfid.	137
Abbildung 25: HRMS-Spektrum von synthetisch hergestelltem roten Farbstoff.	138

Abbildung 26: Vergleich der FTIR-Spektren von synthetischem und natürlichem rotem Farbstoff.	139
Abbildung 27: Assoziation: Tetrathhiaporphyrin mit polymeren Verbindungen eines <i>Allium</i> -Extraktes.....	140
Abbildung 28: Kristalle des roten Farbstoffes unter dem Mikroskop (100x Vergrößerung).	146
Abbildung 29: Kristallstruktur des roten Farbstoffes mit enthaltenem Ethylacetat, Cyclohexan sowie einer unbekannten Verbindung (evtl. Benzol, unten links). .	147
Abbildung 30: Kristallstruktur des roten Farbstoffes, kristallisiert aus Ethylacetat. ...	148
Abbildung 31: Aufnahme von Kristallen des roten Farbstoffes nach fünf Min. Exposition gegenüber Luft und Licht während der Mikroskopie (8 Watt) (100x).	149
Abbildung 32: RF Kristall nach fortgeschrittener Zersetzung.	150
Abbildung 33: Farbveränderung des roten Farbstoffs nach Deprotonierung durch NaH in DMF.	151
Abbildung 34: HRMS Analytik eines methanolischen <i>Allium giganteum</i> -Extraktes im <i>negative Mode</i>	151
Abbildung 35: MSMS Messung des vermuteten Pyrrolyl-lactylsulfoxids im <i>positive Mode</i>	153
Abbildung 36: MS/MS-Messung des vermuteten Pyrrolyl-lactylsulfoxids im <i>negative Mode</i>	154
Abbildung 37: HPLC-Chromatogramme (Aminophase) eines <i>Allium</i> -Extraktes nach Ionenaustauschchromatographie vor und nach Zugabe von NaOH mit deutlicher Abnahme des Signals bei ca. 1,6 Min.	155
Abbildung 38: Prep. HPLC-Chromatogramm (Aminophase) eines <i>A. jesdianum</i> -Extraktes nach Ionenaustauschchromatographie.	156
Abbildung 39: Analytisches HPLC-Chromatogramm (Aminophase) eines <i>A. jesdianum</i> -Rohextraktes; Detektion bei drei unterschiedlichen Wellenlängen (optimale Detektion der Pyrrolverbindungen um 230 nm).	157
Abbildung 40: AuNP: Erfolgreich synthetisierte Charge (links); durch nicht ganz saubere Glasgeräte agglomerierende Au-NP (rechts).	158
Abbildung 41: SPR Sensogramme von AuRP, die auf einer Goldsensoroberfläche immobilisiert wurden, unter Cu ²⁺ Einwirkung in versch. Konzentrationen.	161
Abbildung 42: Schematische Darstellung des PHCP Copolymers.	163
Abbildung 43: Mannan-ConA-Sav Bindungsstudien auf PHCP: 1. Zugabe Mannan (1 mg/mL); 2. Blockierung mittels Candor® (Blocking-Lösung); 3. Zugabe ConA-Sav (300 µg/mL).	164
Abbildung 44: Schematische Darstellung des PC ₁₆ P Copolymers.	164
Abbildung 45: Mannan-ConA-Sav Bindungsstudien auf PC ₁₆ P: 1. Zugabe Mannan (1 mg/mL); 2. Blockierung mittels Candor® (Blocking-Lösung); 3. Zugabe ConA-Sav (300 µg/mL).	165
Abbildung 46: SPR Sensogramm einer PHCP EDC/NHS Mannan ConA-Sav Bindungsstudie mit anschließender Regenerierung mittels Methyls α-D-Mannopyranosid.	166

Abbildung 47: AFM Aufnahmen (HQ:NSC14AIBS) von modifizierten SPR- Chips: A) Goldoberfläche des Chips ohne Modifikation; B) Detailaufnahme der Goldoberfläche (roughness 2.56 nm); C) Mittels Pyrrol-N-C ₁₆ Pyrrol Copolymer und Mannan modifizierte Oberfläche; D) Mittels Pyrrol-N-C ₁₆ Pyrrol Copolymer und Mannan modifizierte Oberfläche nach Bindung von ConA-Sav (ConA-Sav Agglomerate sichtbar).....	167
Abbildung 48: Theoretische Darstellung der Gold-BSA-Sandwich-Oberfläche.	168
Abbildung 49: SPR Sensogramm: Bindung von AuNP auf einer BSA Oberfläche mit anschließender Immobilisierung von Sav.	169
Abbildung 50: Schematischer Aufbau der SPR-Studien für Gold-BSA-Sandwich-Oberflächen.	170
Abbildung 51: SPR Sensogramm: Bindungsstudien von Anti-Albumin an Sav auf einer Au/BSA/AuNP Oberfläche (Nullpunkt dieser Abb. wurde auf 1400 s des Gesamtsensogramms gesetzt).	171
Abbildung 52: Winkelverschiebung bei der Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen von Anti-Albumin (Betrachtung des Bindungsereignisses von Anti-Albumin); Schritte vor der Zugabe von Anti-Albumin: Immobilisierung mit BSA (2 mg/mL), AuNP (~20 nm), Sav (1 mg/mL).	172
Abbildung 53: Immobilisierungsstrategie für MA-CM-Polysaccharide	173
Abbildung 54: Bindung von ConA-Sav an MA-CM-Sacchariden.....	174
Abbildung 55: SPR Sensogramme Vergleich der Beladung von MA-CM-Polysacchariden mit ConA-Sav-Fusionsprotein.	175
Abbildung 56: SPR Sensogramme eines BSA / Anti-BSA Essays auf MA-CM-Oberflächen. Et-NH ₂ : Blockierung unspezifischer Bindungen.	176
Abbildung 57: Mögliche Anordnungen von Polysacchariden auf der SPR-Oberfläche.	176
Abbildung 58: Säulenchromatographische Trennung nach Umsetzung von 3,3'-Bithiohen mit Schwefel.....	185
Abbildung 59: Gelbe schwefelhaltige Verbindung (5,5'-DiLi-2,2'-bithiophen +S ₈) nach fraktionierter Kristallisation aus Cyclohexan.....	186
Abbildung 60: Verschiedene, für die Synthese von Tetrathiaporphyrin-Analoga potentiell geeignete Pyrrole.....	191
Abbildung 61: Theoretischer Aufbau einer verbesserten Elektropolymerisationsanlage.	195
Abbildung 62: Potentielle Reaktionen bei der Substitution des Tetrathiaporphyrins. .	198
Abbildung 63: Entwicklungsstufen des Kristallisationsexperiments: links: erste Versuche zur Kristallisation, mitte: optimierte Kristallisation mit großen Kristallen; rechts: finale Kristallstruktur.....	204
Abbildung 64: Beispiele für mögliche Immobilisierung von Verbindungen auf Oberflächen durch EDC/NHS oder adsorptive Methoden.....	205

Schema 1: Biologische Abläufe von Auf- und Abbau von CSOs in <i>Allium sativum</i>	21
Schema 2: Allinasereaktion am Beispiel von Alliin.....	23
Schema 3: Synthesen verschiedener Dithiine nach Schroth und Le Gal <i>et al.</i> ^{[21],[22]}	25
Schema 4: Synthese eines 12-gliedriges Thiophen-bis-disulfid nach Schroth <i>et al.</i> ^{[21],[22]}	26
Schema 5: Bekannte Syntheserouten von Porphyrinen. ^{[30],[31]}	28
Schema 6: Synthese von Marinopyrrol A nach Kanakis <i>et al.</i> ^[38]	30
Schema 7: Mögliche Methoden zur Darstellung von Thiocyanaten. ^[42]	32
Schema 8: Synthese von Alliin. ^[13]	34
Schema 9: Methoden der asymmetrischen Oxidation an Schwefel-Atomen. ^[53]	35
Schema 10: Moderne, nicht stereoselektive Oxidations-Methoden. ^{[56],[55]}	36
Schema 11: Synthese der 2,2'- und 3,3'-Bipyrrolen. ^{[60],[61]}	38
Schema 12: Synthese von Diaryl[1,2]dithiinen. ^[62]	39
Schema 13: Bildung des roten Farbstoffes nach Kucerova <i>et al.</i> ^[63]	39
Schema 14: Aminosäuren-Derivatisierung mittels AQC, DABS-Cl oder OPA.	46
Schema 15: Elektropolymerisation von Pyrrolen nach Diaz <i>et al.</i> ^[109]	65
Schema 16: Theoretische Syntheserouten des roten Farbstoffes und seiner Analoga. ..	66
Schema 17: Alternative Synthese des roten Farbstoffes und seiner Analoga.	67
Schema 18: Syntheseroute von Dithiinen via disulfidischen Edukten.	67
Schema 19: Thiocyanierungsmethoden für Tipspyrrol.	126
Schema 20: Bildung von NSCNS bzw. Thiocyanogen.	127
Schema 21: NBS Bromierung von Tipspyrrol.	127
Schema 22: Syntheseweg zur Darstellung von Bitipspyrrol und seinen thiocyanierten Folgeprodukten.	128
Schema 23: Synthese 2,2' und 3,3'-Bithiophen.	129
Schema 24: Reaktionen von Indol und Bithiophenen mit Schwefel sowie ihre möglichen Produkte.	129
Schema 25: Entwickelte Indol Thiocyanierungs-Methode.	131
Schema 26: Produkte der Umsetzung von 2-Thiocyanatopyrrol mit NaOH in Methanol.	132
Schema 27: Bildung von Thioethern, Disulfiden sowie Carbonimidothioaten in Methanol und Ethanol.	134
Schema 28: Produkte der alkalischen Hydrolyse von 3-SCN-Indol in Methanol.	134
Schema 29: Syntheseroute des roten Farbstoffs.	137
Schema 30: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes zur Untersuchung des Verhaltens von NPRP bei Zugabe eines Oxidationsmittels.	160
Schema 31: Synthese von N-Substituierten Pyrrolen für SPR-Oberflächenmodifikation.	162
Schema 32: Postulierte Mechanismen zur Bildung der Alkylthioether sowie Carbonimidothioate.	179
Schema 33: Weitere Reaktion der bei der Hydrolyse von Thiocyanaten gebildeten Sulfensäure.	179
Schema 34: Reaktionspfade in alkoholhaltigem und alkoholfreiem Medium.	181

Schema 35: Potentielle makrocyclische Verbindungen bei Zugabe kationischer Templates.	182
Schema 36: Mögliche Reaktionen von Bipyrrolen mit S ₂ Cl ₂ oder elementarem Schwefel.	184
Schema 37: Theoretische Synthese von Thiophen-Analoga des RF.	186
Schema 38: Bildung des roten Farbstoffes aus Pyrrolthiocyanat.	200
Schema 39: Bildung von Thioethern aus Thiocyanaten.	202

1 Einleitung

1.1 Die Gattung *Allium*

Von den über 900 bekannten Arten der Gattung *Allium* (A.) werden einige seit mehr als einem Jahrtausend vom Menschen geschätzt und angebaut. Weltweit wurden im Jahr 2017 alleine von *A. cepa* etwa 98 Millionen Tonnen geerntet, von *A. sativum* immerhin 28 Millionen Tonnen (FAO), was einige der Spezies zu kommerziell höchst wichtigen Würz- und Gemüsepflanzen macht. Zu den bereits genannten Arten mit besonderer wirtschaftlicher Bedeutung kommen noch weitere Spezies dazu, wie Lauch (*A. ampeloprasum*) und Schnittlauch (*A. schoenoprasum*), die von weiterem wirtschaftlichem Interesse sind (Tabelle 1).^[1] Es finden sich auch innerhalb des Genus Spezies mit höchst interessanten pharmakologischem Wirkspektrum. Zu diesen zählen antitumor, antibakterielle, blutdrucksenkende sowie antifungale Eigenschaften.^[2] Zahlreiche Arten, zumeist solche mit besonders farbigen oder großen Blütenständen, finden auch als Zierpflanzen Verwendung. Das natürliche Verbreitungsgebiet ist die nördliche Hemisphäre, mit wenigen Ausnahmen wie *A. dregeanum*, welche wild in Südafrika vorkommt.^[3] Fritsch und Friesen beschreiben das Hauptzentrum der Entwicklung der Gattung als den Bereich vom Mittelmeergebiet bis Mittelasien und Pakistan, wobei allein über 120 Spezies für das Gebiet des Irans beschrieben sind.^[4] Wenige Arten konnten sich über die gesamte Nordhalbkugel der Erde, sogar bis in subarktische Gefilde, verbreiten. Angepasst an das jeweilige Habitat besitzen die Arten sowohl unterschiedlichste physiologische als auch morphologische Charakteristika und besiedeln viele verschiedene Standorte, von Wüsten, Halbwüsten oder Hochgebirgen bis hin zu Wäldern (*A. ursinum*), Salzwiesen (*A. angulosum*) oder auch Flussufern und Küsten (*A. schoenoprasum*).^[3]

Unterteilt ist die Gattung in 15 Untergattungen, die zusammen mit den Sektionen (für subg. *Melanocrommyum*) in Abb.1 dargestellt sind. Das in dieser Arbeit besonders betrachtete Subgenus, umfasst mehr als 150 Arten und gehört somit zu den größten Subgenera. Des Weiteren sind Spezies mit roter Verfärbung nach Verletzung gerade hier besonders häufig zu finden.

Tabelle 1: Kultivierte *Allium*-Spezies und ihre Verbreitung nach Fritsch und Friesen (2002).

Botanical names of the crop groups	Other names used in the literature	Area of cultivation	English names
<i>A. altaicum</i> Pall.	<i>A. microbulbum</i> Prokh.	South Siberia	Altai onion
<i>A. ampeloprasum</i> L.			
Leek group	<i>A. porrum</i> L., <i>A. ampeloprasum</i> var. <i>porrum</i> (L.) J. Gay	Mainly Europe, North America	Leek
Kurrat group	<i>A. kurrat</i> Schweinf. ex Krause	Egypt and adjacent areas	Kurrat, salad leek
Great-headed garlic group	<i>A. ampeloprasum</i> var. <i>holmense</i> (Mill.) Aschers. et Graebn.	Eastern Mediterranean, California	Great-headed garlic
Pearl-onion group	<i>A. ampeloprasum</i> var. <i>sectivum</i> Lued.	Atlantic and temperate Europe	Pearl onion
Tarée group		Iran	Tarée irani
<i>A. canadense</i> L.		Cuba	Canada onion
<i>A. cepa</i> L.			
Common onion group	<i>A. cepa</i> ssp. <i>cepa</i> /var. <i>cepa</i> , <i>A. cepa</i> ssp. <i>australe</i> Kazakova	Worldwide	Onion, common onion
Ever-ready onions	<i>A. cepa</i> var. <i>perutile</i> Stearn	Great Britain	Ever-ready onion
Aggregatum group	<i>A. ascalonicum</i> auct. hort., <i>A. cepa</i> var. <i>aggregatum</i> G. Don, var. <i>ascalonicum</i> Backer, ssp. <i>orientalis</i> Kazakova	Nearly worldwide	Shallot, potato onion, multiplier onion
<i>A. consanguineum</i> Kunth		North-East India	
<i>A. × cornutum</i> Clem. ex Vis.*	<i>A. cepa</i> var. <i>viviparum</i> auct.*	Locally in South Asia, Europe, Canada, Antilles	
<i>A. chinense</i> G. Don	<i>A. bakeri</i> Regel	China, Korea, Japan, South-East Asia	Rakkyo, Japanese scallions
<i>A. fistulosum</i> L.		East Asia, temperate Europe and America	Japanese bunching onion, Welsh onion
<i>A. hookeri</i> Thw.		Bhutan, Yunnan, North-West Thailand	
<i>A. kunthii</i> G. Don	<i>A. longifolium</i> (Kunth) Humb.	Mexico	
<i>A. macrostemon</i> Bunge	<i>A. uratense</i> Franch., <i>A. grayi</i> Regel	China, Korea, Japan	Chinese garlic, Japanese garlic
<i>A. neapolitanum</i> Cyr.	<i>A. cowanii</i> Lindl.	Central Mexico	Naples garlic
<i>A. nutans</i> L.		West and South Siberia, Russia, Ukraine	
<i>A. obliquum</i> L.		West Siberia, East Europe	Oblique onion
<i>A. oschaninii</i> O. Fedtsch.		France, Italy	French shallot*
<i>A. × proliferum</i> (Moench) Schrader			
East Asian group	<i>A. aobanum</i> Araki, <i>A. wakegi</i> Araki	China, Japan, South-East Asia	Wakegi onion
Eurasian group	<i>A. cepa</i> var. <i>viviparum</i> (Metzg.) Alef., <i>A. cepa</i> var. <i>proliferum</i> (Moench) Alef.	North America, Europe, North-East Asia	Top onion, tree onion, Egyptian onion, Catawissa onion
<i>A. pskemense</i> B. Fedtsch.		Uzbekistan, Kyrgyzstan, Kazakhstan	
<i>A. ramosum</i> L.	<i>A. odorum</i> L., <i>A. tuberosum</i> Rottl. ex Sprengel	China and Japan, worldwide now	Chinese chive, Chinese leek
<i>A. rotundum</i> L.	<i>A. scorodoprasum</i> ssp. <i>rotundum</i> (L.) Stearn	Turkey	
<i>A. sativum</i> L.			Garlic
Common garlic group	<i>A. sativum</i> var. <i>sativum</i> , <i>A. sativum</i> var. <i>typicum</i> Regel	Mediterranean area, also worldwide	
<i>Longicuspis</i> group	<i>A. longicuspis</i> Regel	Central to South and East Asia	
<i>Ophioscorodon</i> group	<i>A. sativum</i> var. <i>ophioscorodon</i> (Link) Döll	Europe, also worldwide	
<i>A. schoenoprasum</i> L.	<i>A. sibiricum</i> L.	Worldwide in temperate areas	Chive
<i>A. ursinum</i> L.		Central and North Europe	Ramsons
<i>A. victoralis</i> L.	<i>A. microdictyon</i> Prokh., <i>A. ochotense</i> Prokh.	Caucasus, Japan, Korea, Europe (formerly)	Long-root onion, long-rooted garlic
<i>A. wallichii</i> Kunth	<i>A. platyphyllum</i> Diels, <i>A. lancifolium</i> Stearn	East Tibet	

1.2 Die Untergattung *Melanocrommyum*

Die meisten der 150 Arten sind diploid ($\kappa = 8$). Unterteilt ist die Untergattung nach *Friesen et al.* wiederum in 13 Sektionen, die in Abbildung 1 dargestellt sind.^[5] Das Verbreitungsgebiet dehnt sich, ausgehend Zentralasien, nach Westen bis in den ganzen Mittelmeerraum und im Norden bis in die südlichen Teile Sibiriens aus.^[6] Da das Hauptverbreitungsgebiet auch gebirgige und teils fast unzugängliche Gebiete des Irans umfasst, werden dort mit recht hoher Häufigkeit neue Spezies entdeckt.^[7] Die kulinarisch wohl wichtigste Spezies der Untergattung ist *A. stipitatum*, im deutschen Sprachraum auch „iranische Schalotte“, im Gebiet des Irans „Mooseer“ oder „Musir“ genannt. „Musir“ wird in seinem Verbreitungsgebiet, besonders dem Zagros-Gebirge, ausschließlich wild gesammelt.^[8]

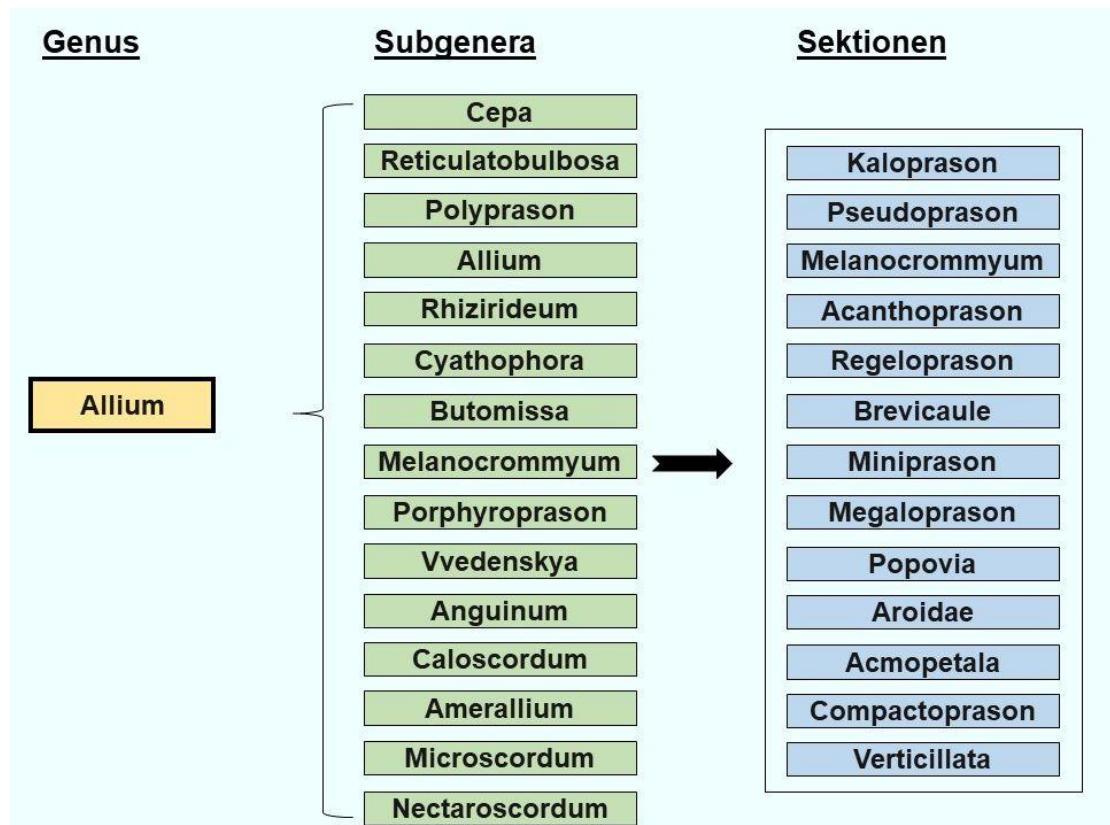


Abbildung 1: Übersicht über das Genus *Allium*.

Nach neueren Analysen von Fritsch *et al.* (2010) wurde die Untergattung in 20 Sektionen sowie 22 Untersektionen weiter aufgeteilt.^[9]

1.3 Schwefelverbindungen, Allinasereaktion und Sekundärmetabolite

Allium-Spezies produzieren verschiedene (+)-Cysteinsulfoxide, die durch Allinasereaktion in Primär- und Sekundärmetabolite überführt werden. Die meisten der medizinisch interessanten Wirkungen sowie das Aroma der *Allium*-Arten leiten sich von diesen Substanzen ab.^[11] Weitere Schwefelverbindungen stellen γ -Glutamylpeptide aus den korrespondierenden Cysteinsulfoxiden sowie Zwiebelane dar, welche aus *A. cepa* isoliert wurden und ein Folgeprodukt des *syn*-Propanthial-S-oxids darstellen. In Abb. 2 wird eine Auswahl an natürlich vorkommenden Cysteinsulfoxiden gezeigt. Zur Nomenklatur und Unterscheidung wird der Rest des Sulfoxid- Schwefelatoms herangezogen.

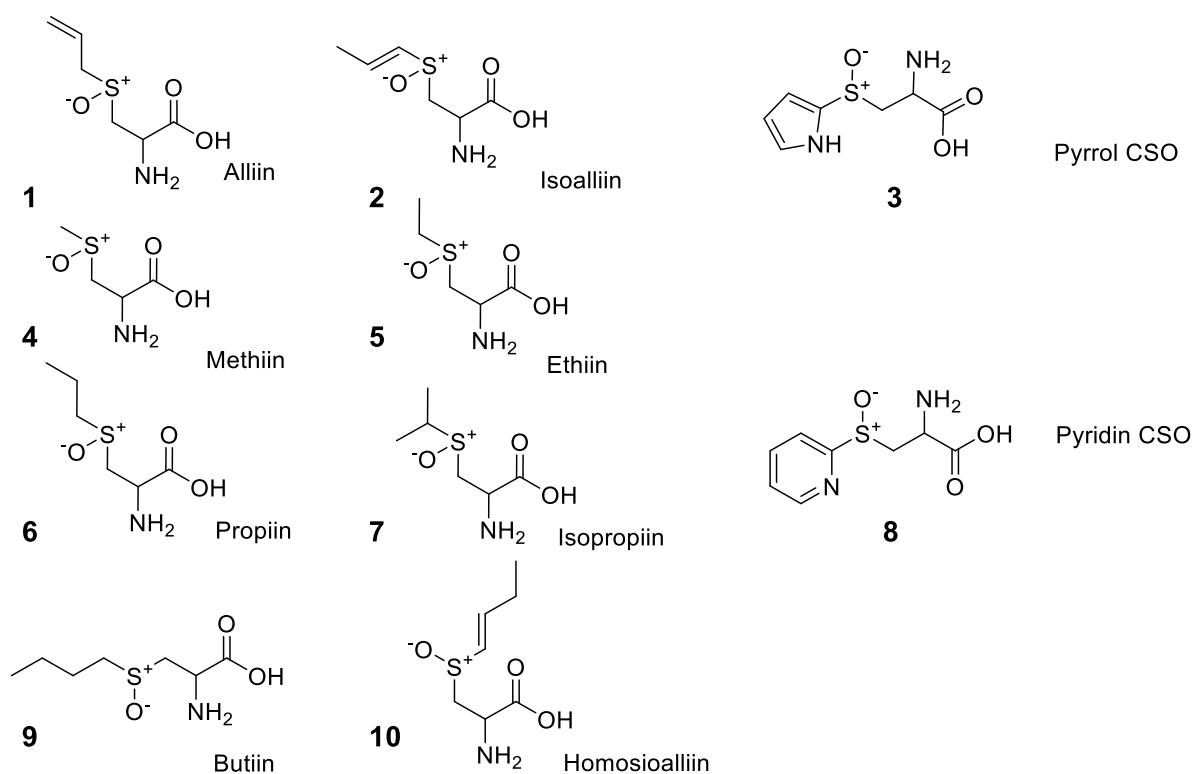
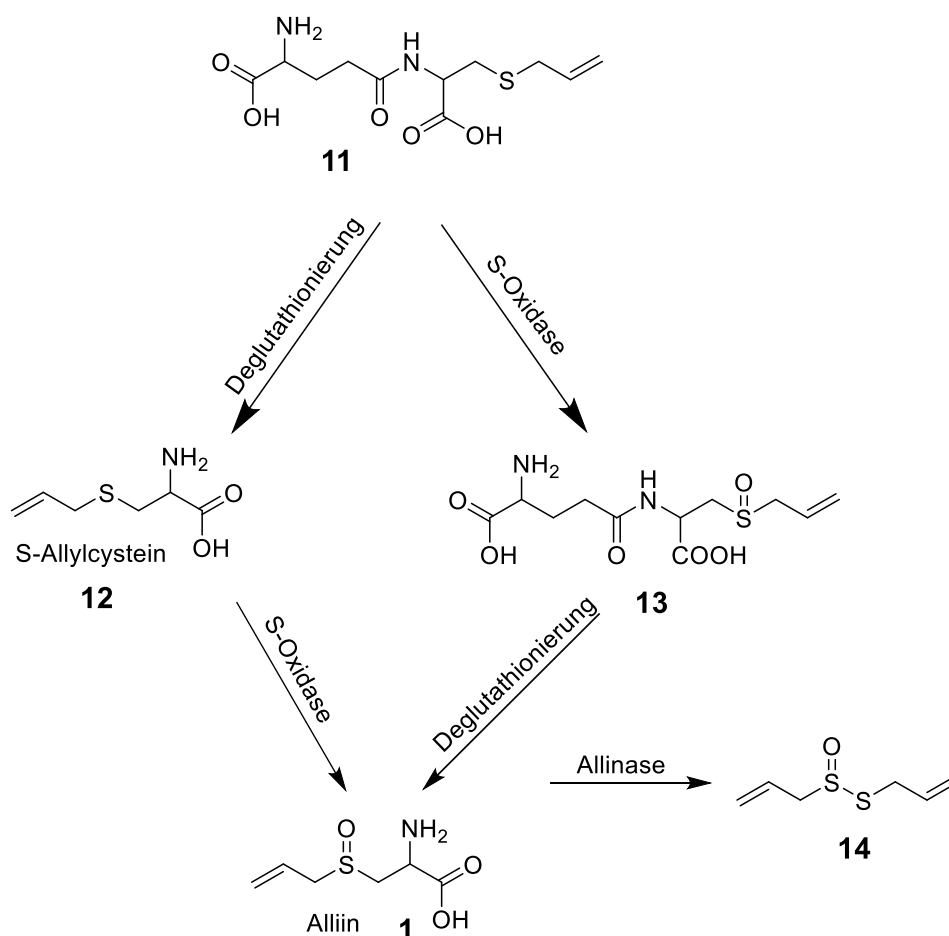


Abbildung 2: Ausgewählte natürlich vorkommende Cysteinsulfoxide.

Die in Schema 1 gezeigten Biosynthesepfade (*Allium sativum*), ausgehend von γ -Glutamyl-S-alkylcysteinen, stellen die wichtigsten biosynthetischen Pfade der Cysteinsulfoxidsynthese dar.^[10]



Schema 1: Biologische Abläufe von Auf- und Abbau von CSOs in *Allium sativum*.

Nach Lawson *et al.* stellen in frischem Pflanzenmaterial γ -Glutamyl-S-alkylcysteinsulfoxide einen Hauptteil der Organoschwefelverbindungen (45 %) dar, jedoch werden diese durch Lagerung des Pflanzenmaterials auch bei 4°C binnen weniger Wochen fast vollständig zu den jeweiligen Cysteinsulfoxiden umgesetzt.^[11]

Diese Cysteinsulfoxide können von Allinase (Abb. 3) enzymatisch umgesetzt werden. Die gebildeten Sulfensäuren bilden aufgrund ihrer hohen Reaktivität bzw. Instabilität rasch Folgeprodukte. Je nach vorhandenen Cysteinsulfoxiden bildet sich eine Vielzahl von Produkten, die sich strukturell teils stark unterscheiden: Ajoene, Thiosulfinsäureester, Vinyldithiine und Zwiebelane sowie weitere, teils noch nicht aufgeklärte Verbindungen.

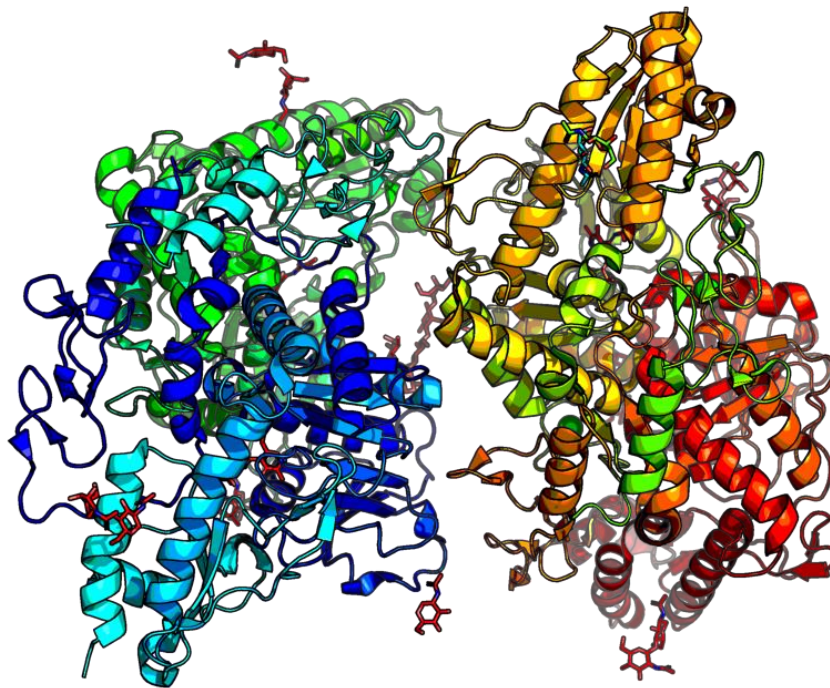
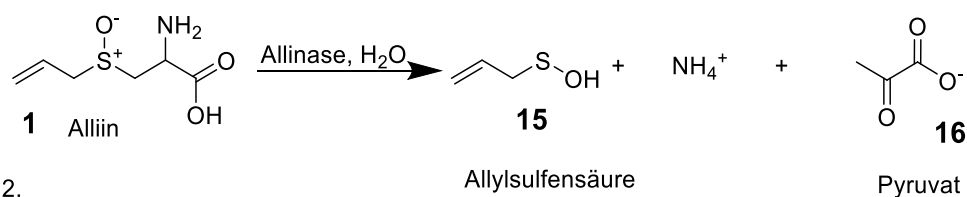


Abbildung 3: Allinase aus *Allium sativum* (erstellt mit Pymole 2.4, PDB: 2HOX).

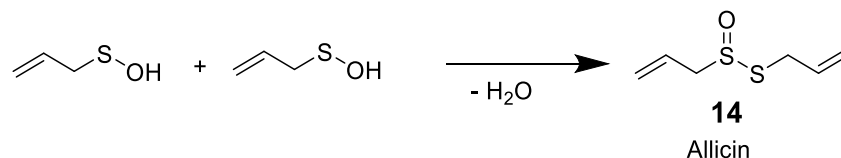
Je mehr verschiedene Cysteinsulfoxide vorhanden sind, desto mehr potentielle Produkte können gebildet werden und die Anzahl der Produkte steigt dabei stark mit der Anzahl der vorhandenen Cysteinsulfoxide.

Bei der Allinase handelt es sich nach Küttner *et al.* um ein Glycoprotein, das als Homodimer vorliegt und ein Molekulargewicht von 102 kDa besitzt, wobei die beiden Untereinheiten aus jeweils 448 Aminosäuren bestehen.^[12] Die Erstbeschreibung des Enzyms gelang Stoll und Seebeck (1949).^[13] Als Cofaktor dient Pyridoxal-5'-phosphat, dass die Reaktion durch Bildung eines Imins mit der Amino-Funktionalität der Cysteinsulfoxide katalysiert. Die Reaktion progressiert bei allen CSO' identisch, lediglich die gebildeten Sulfensäuren und die sich spontan bildenden Thiosulfinate und Folgeprodukte unterscheiden sich (Schema 2). Die Geschwindigkeit der Reaktion wird unter anderem auch von der Allinase bzw. deren Quelle, der *Allium*-Spezies, aus der sie gewonnen wurde, bestimmt. So sind Allinasen aus manchen *Allium* subg. *Melanocrommyium*-Spezies nur relativ schwach aktiv oder zeigen, verglichen mit der Allinase aus *Allium sativum* [Promotionsarbeit Gabriela Mielke 2016], eine relativ geringe Substratbandbreite.

1.

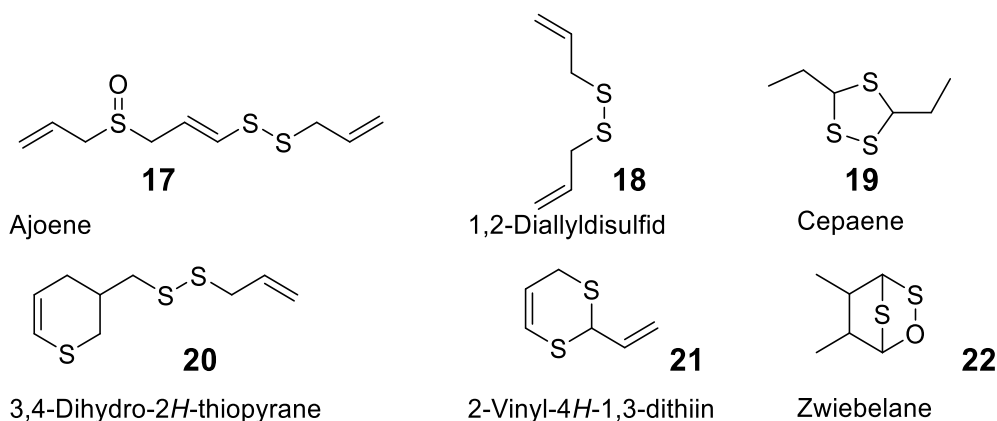


2.



Schema 2: Allinasereaktion am Beispiel von Alliin.

Thiosulfinate sind sowohl in saurem als auch basischem Milieu nicht stabil und reagieren binnen weniger Stunden komplett zu sekundären Verbindungen bzw. zu deren Folgeprodukte weiter. Manche dieser Verbindungen zeigen auch eine Farbveränderung und sind für verschiedenen Phänomene, wie das „garlic greening“ und „onion pinking“, verantwortlich. Von Interesse ist hierbei, dass manche der für die Verfärbung verantwortlichen Verbindungen auch pyrrolhaltig sein sollen. In Abb. 4 sind einige dieser Verbindungen gezeigt.^[14]

Abbildung 4: Sekundäre Aromaverbindungen der Gattung *Allium*.

Neuste Forschungsergebnisse von Block *et al.* zeigen zudem, dass sich in *Allium sativum* auch 3,4-Dimethylthiolane finden lassen.^[15] Zu den interessantesten sekundären Verbindungen zählt jedoch der rote Farbstoff, der von einigen Arten der Subg. *Melanocrommyum* bei Verletzung gebildet wird. Ein paar dieser Arten, welche im Verlauf der Promotionsarbeit verwendet wurden, sind: *Allium macleeanii* BAKER, *Allium jesdianum* BOISS.

& BUHSE, *Allium giganteum* REGEL sowie *Allium rosenorum* FRITSCH, um nur die Spezies zu nennen, mit denen hauptsächlich während der Promotion gearbeitet wurden.

Laut Literatur wird dieser Farbstoff auf Pyrrol-CSO bzw. dessen Sulfensäure nach Allinasreaktion gebildet, jedoch nicht von allen Arten der Untergattung. Eine besonders starke Rotfärbung zeigt sich im Bereich der Leitbündel. In diesen Bereichen scheint die Konzentration des Pyrrol-CSO (**3**) bzw. der Allinase besonders hoch zu sein. Strukturvorschläge wurden von Jedelská *et al.* sowie Kucerová *et al.* gemacht.^[16,17]

Bei beiden Forschungsgruppen wird von einem Dipyrrolodithiin ausgegangen. Die HRMS und NMR Studien der Verbindung lassen jedoch theoretisch mehrere Verbindungen ähnlicher Struktur zu, die in Abb. 5 dargestellt sind.

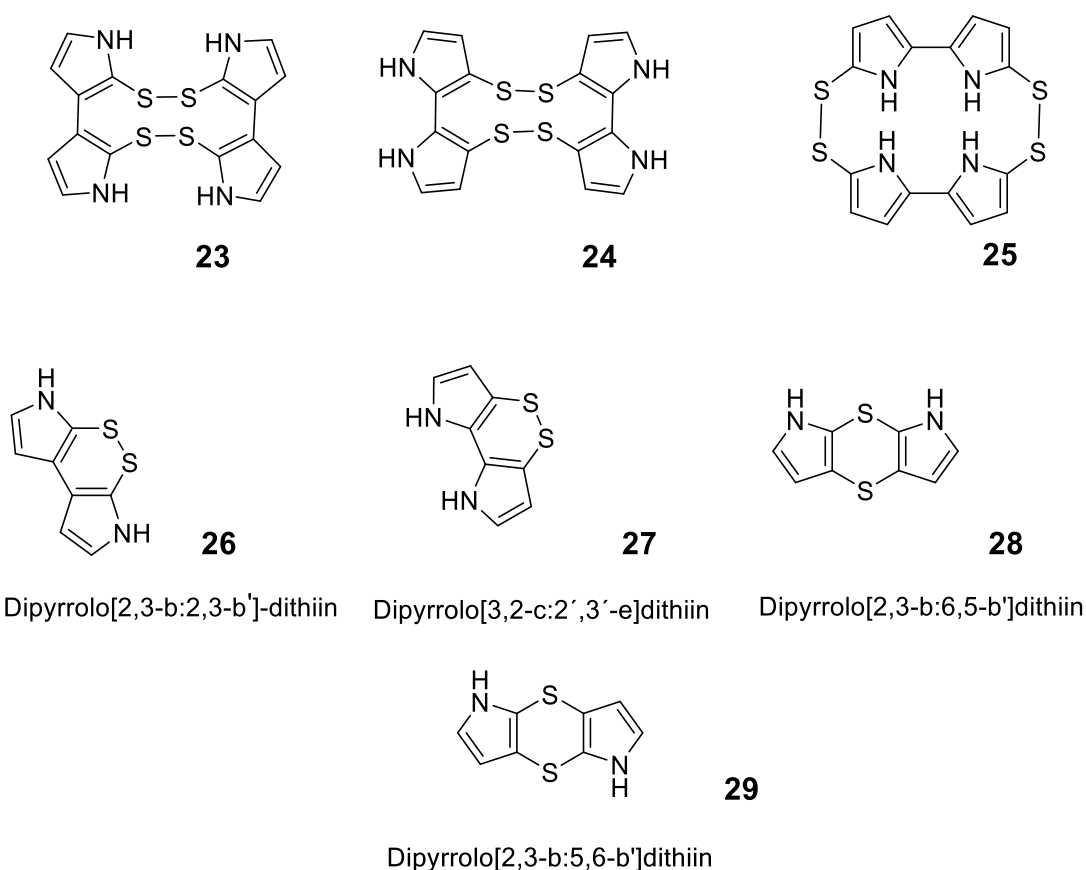
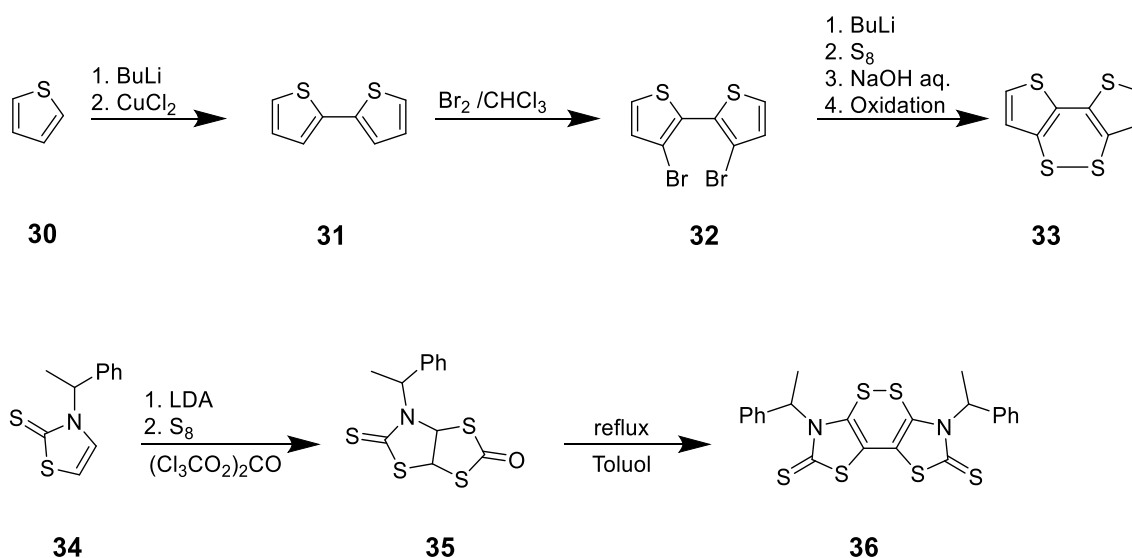


Abbildung 5: Potentielle dimere und tetramere Strukturen des roten Farbstoffs aus *Allium* Subg. *Melanocrommyum*.

Die dargestellten dimeren Verbindungen gehören zur Familie der Dithiine, deren rote Farbe eine Eigenschaft darstellt, die nur schwer erklärt werden kann. Dithiine sind auch natürliche Produkte der weiteren Umsetzung von Allicin und kommen somit in vielen

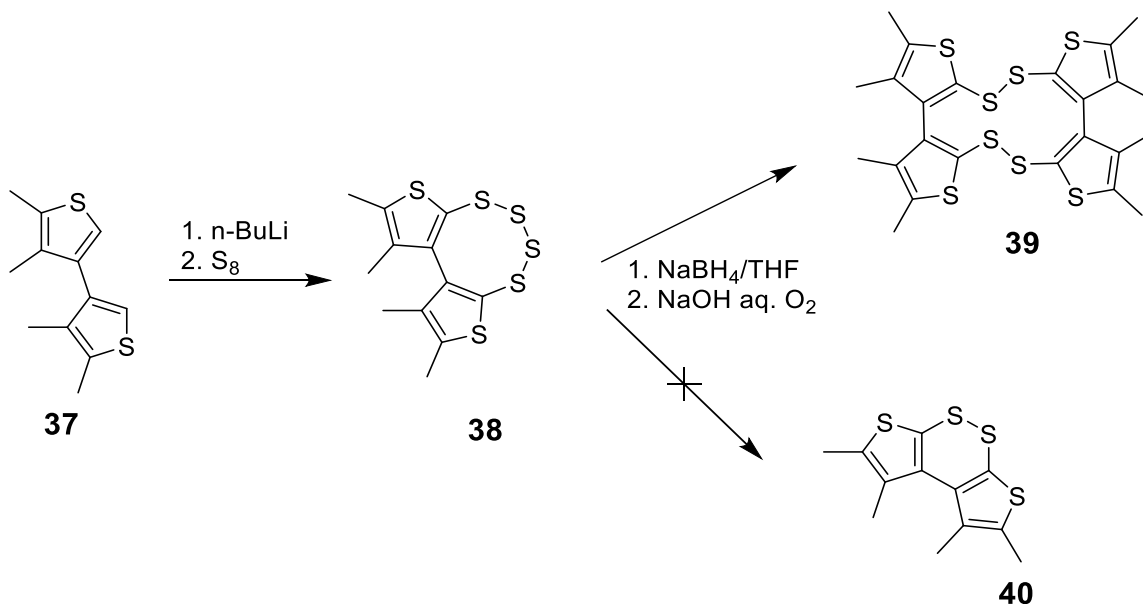
Allium-Spezies natürlich vor. Rodriguez *et al.* konnte das Dithiin Thiarubin in Spezies der Gattung *Aspilia* nachweisen.^[18] Verbindungen dieser Familie zeigen viele pharmakologisch relevante Eigenschaften, wie antifungale und antibakterielle Wirkungen. Der Absorptionsbereich liegt je nach Substitution zwischen 400 nm und 510 nm und kann durch einen Elektron-Übergang aus den Grenzorbitalen durch *Kohn-Sham*-Orbitale erklärt werden.^[19] Mehrere Thienodithiine wurden von Schroth *et al.* synthetisiert (s. Schema 3) und die Auswirkungen der Annelanden auf die Absorption erforscht. Es zeigte sich, dass Dithieno[1,2]dithiine, wie **33**, im Bereich von 450 nm absorbieren und somit eine rote Farbe aufweisen. Die Röntgenstrukturanalyse dieser Verbindungen zeigt, dass der „Disulfidring“ verdreht vorliegt. Der dihedrale C-S-S-C-Winkel beträgt 51°, die beiden Thiofen-Ebenen sind um 20° gegeneinander verdreht.^[20,21] Weitere literaturbekannte Dithiine sind die von le Gal *et al.* synthetisierten Verbindungen (**36**), diese wurden ausgehend von einem Thiazol-2-thion dargestellt (Schema 3) und zeigen eine Absorption im Bereich von 477 nm ($\lambda_{\text{max.}}$: 354 nm und 441 nm) sowie interessante Redox-Eigenschaften.^[22]



Schema 3: Synthesen verschiedener Dithiine nach Schroth und Le Gal *et al.*^[21,22]

Dithieno[3,2-c:2',3'-e]dithiin **33** ($\lambda_{\text{Abs.}}$: 441 nm) besitzt eine ziegelrote Farbe, während Dibenzoc[e,e][1,2]dithiin ($\lambda_{\text{Abs.}}$: 407 nm) nahezu farblos ist. Diese Diskrepanz zwischen stark aromatischen anellierten Dithiinen und weniger stark aromatisch anellierten Dithiinen könnte als Indikator für den olefinischen Charakter von Annelanden dieser Verbindungsklasse dienen.

Schroth *et al.* berichten weiterhin, dass weitere Versuche, das Isomer [2,3-c]dithiin zu synthetisieren, scheiterten. Gründe hierfür könnten π -elektronischer oder sterischer Art sein. Dies konnte jedoch von den Autoren nicht weiter geklärt werden. Unter identischen Reaktionsbedingungen, wie bei der Synthese von Substanz **33**, wurde lediglich ein 12-gliedriges cyclisches Bis-disulfid **39** erhalten (Schema 4).



Schema 4: Synthese eines 12-gliedriges Thiophen-bis-disulfid nach Schroth *et al.*^[21,22]

Diese Erkenntnis bildete eine der Grundlagen zur Anfechtung der bis dato publizierten dimeren Strukturen, die zusammen mit der Absorption der Verbindung zu erheblichen Zweifeln an deren Korrektheit führten.

1.4 Porphyrine

Porphyrine sind in der Natur ubiquitär und sind in fast jedem Bereich der Naturwissenschaften zu finden. Zu den wichtigsten porphyrinhaltigen Verbindungen zählen das Häm, Chlorophyll oder auch das Cyanocobalamin (Vitamin B12) (Abb. 6). Die Absorption erfolgt im Bereich von ca. 400 bis 500 nm, der sogenannten *Soret* Bande. Durch spezifische Absorption unterschiedlich substituierter Porphyrin-Systeme lassen sie sich gut spektroskopisch unterscheiden.^[23] Die Struktur des Häms wurde von Küster *et al.* bereits vor mehr als 100 Jahren geklärt.^[24]

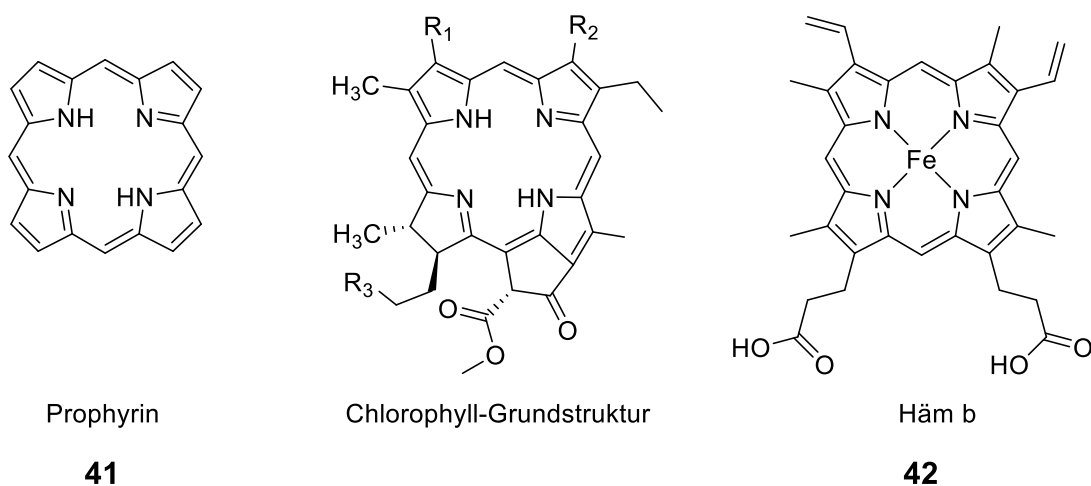
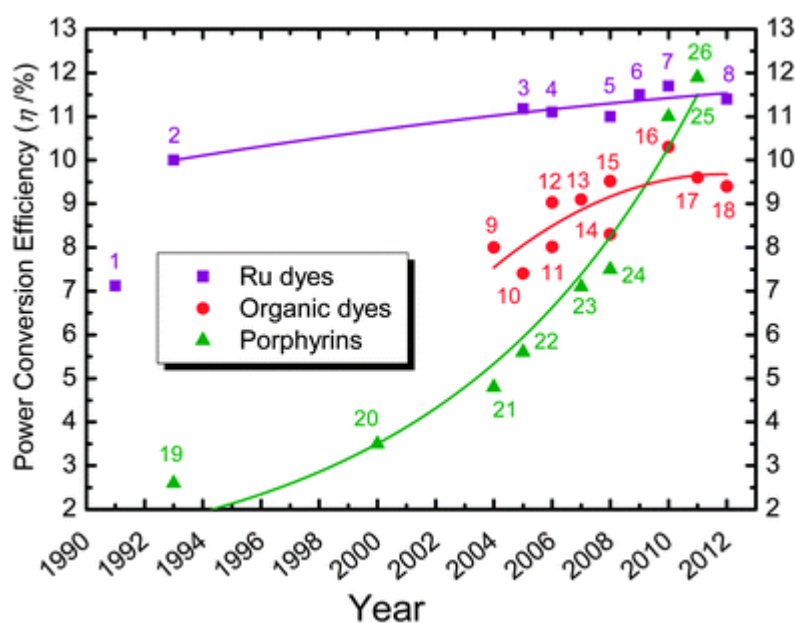
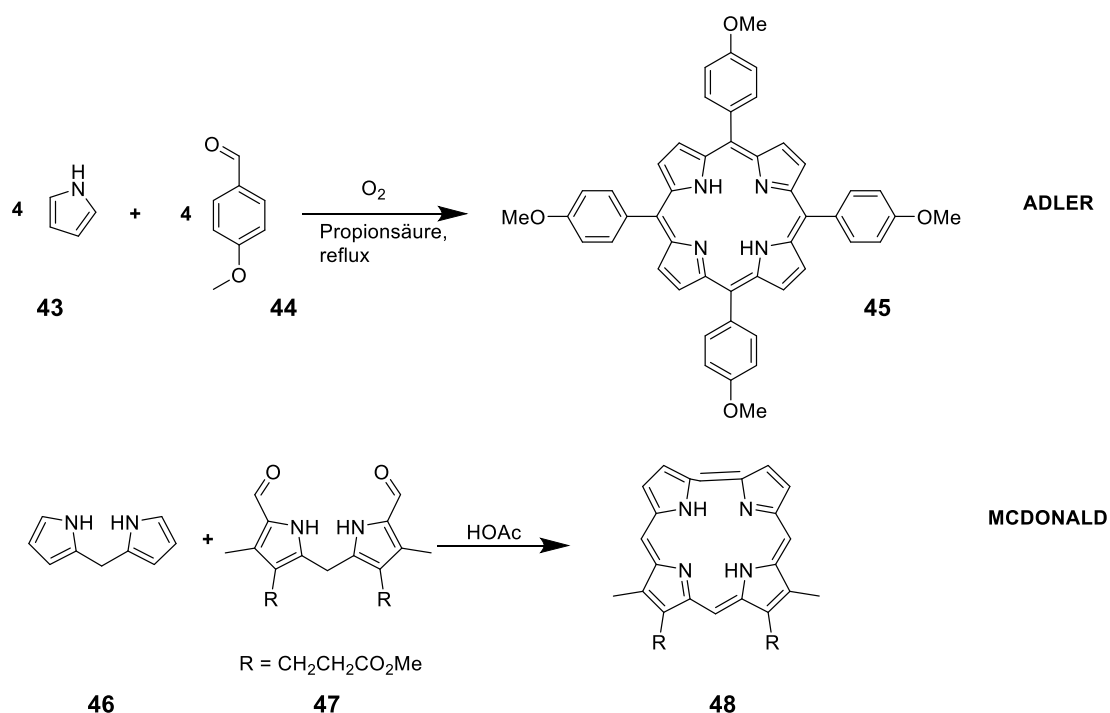


Abbildung 6: Porphyrin und porphyrinbasierende Verbindungen.

Ihre Bedeutung erstreckt sich in der Natur von der Speicherung und dem Transport von Sauerstoff bis hin zur Photosynthese. In der aktuellen Forschung spielen solche Systeme eine zunehmend bedeutende Rolle, vor allem in der Entwicklung neuer redox-aktiver Farbstoffe für Organo-Solarzellen (DSSCs) (Abb. 7) sowie als Katalysatoren organischer Reaktionen,^[25] ebenso als Marker für biologische Strukturen und als Reagenzien in der Metallionen-Analytik, wobei hier Nachweisgrenzen bis in den Nanogramm-Bereich erreicht werden können.^[26] Der Grund hierfür ist ihre hohe Komplexbildungsneigung.^[27]

Abbildung 7: Entwicklung der Effizienz bei der Umwandlung von Sonnenlicht in nutzbare elektrische Energie verschiedener Farbstoffe für Organo-Solarzellen von 1991 - 2012.^[28]

Die Synthese von einfachen symmetrischen Porphyrinen geht von den jeweiligen Pyrrolverbindungen und Aldehyden aus, jedoch wurden durch intensive Forschung im Bereich der Porphyrinsynthese viele Methoden entwickelt, um eine gezielte Synthese verschiedenster Strukturen zu ermöglichen (Abb. 8).^[29a,30,31,29b] Die meisten der Porphyrinsynthesen sind jedoch, bezüglich der Ausbeuten, stark eingeschränkt und liefern, je nach Synthese, zumeist lediglich zwischen 10-20 % Ausbeute. Die besonders interessante *meso*-Position lässt sich hingegen, mittels verschiedener palladiumkatalysierter Kupplungsreaktionen der bromierten Porphyrine, in guten Ausbeuten erreichen.^[32] Die Vielzahl der bekannten Porphyrinstrukturen und deren interessanten Eigenschaften in vielfältigen Bereichen der Wissenschaft waren sicher einige der Gründe dafür, dass das „Handbook of Porphyrine Science“ in unzähligen Bänden erschien und regelmäßig überarbeitet wird.^[33]



Schema 5: Bekannte Syntheserouten von Porphyrinen.^[30,31]

Ein weiteres Anwendungsgebiet von Porphyrinen stellt die photodynamische Therapie dar (PDT). Durch sie können zumeist, ohne chirurgische Eingriffe, dermatologische Erkrankungen wie Hautkrebs, Akne oder Warzen behandelt werden. Auch Tumore der Lunge, des Gehirns sowie der Brust können durch PDT zwar nicht geheilt, jedoch die Symptome gelindert werden.^[34]

1.5 Pyrrolverbindungen in der Natur

Pyrrol selbst wurde bereits 1834 von F. Runge in Steinkohleteer gefunden. Pyrrolhaltige Naturstoffe spielen bei jeglichen Lebewesen der Erde eine wichtige Rolle. Zu ihnen zählen nicht nur die zuvor genannten Verbindungen Chlorophyll oder Häm, sondern auch Pheromone oder Verbindungen mit antimikrobiellen und antitumorösen Eigenschaften, die zumeist aus marinen Lebensformen stammen. Ein paar wichtige Vertreter dieser Naturstoffe sind in Abb. 9 dargestellt.

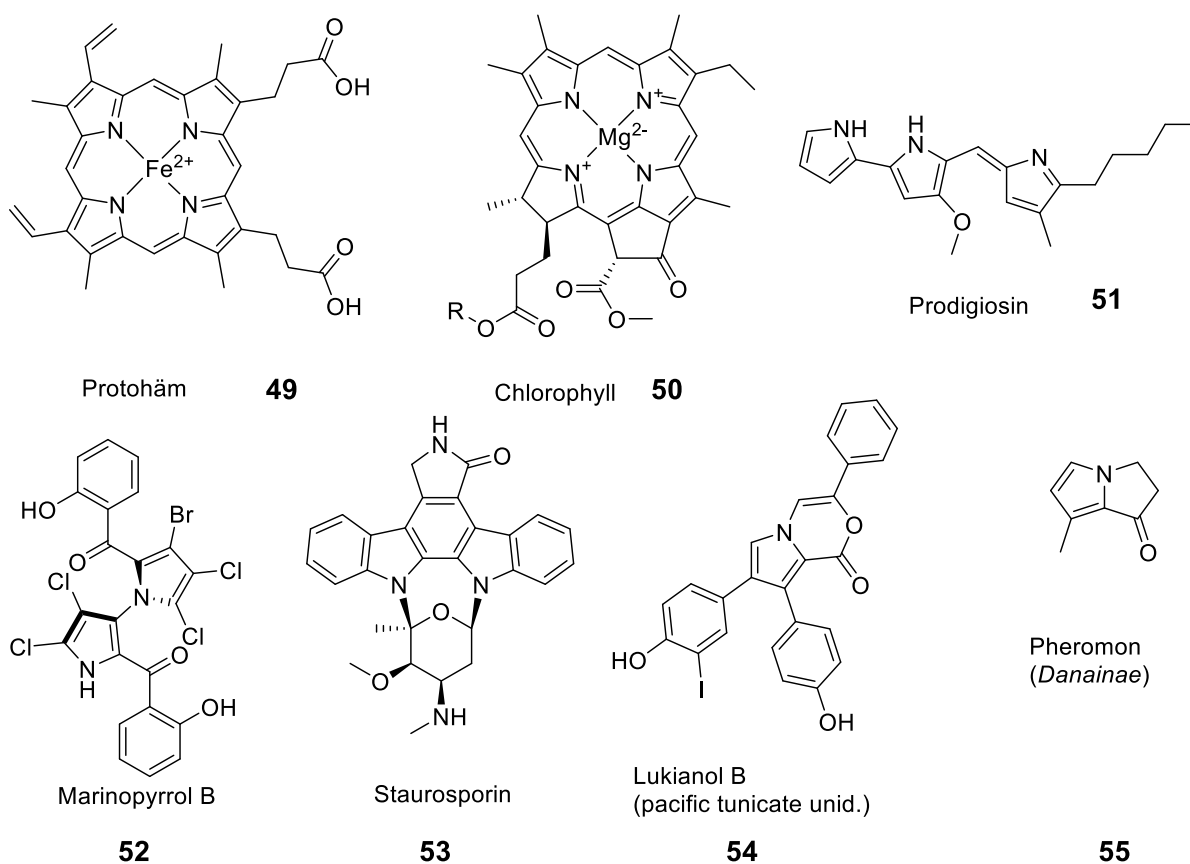
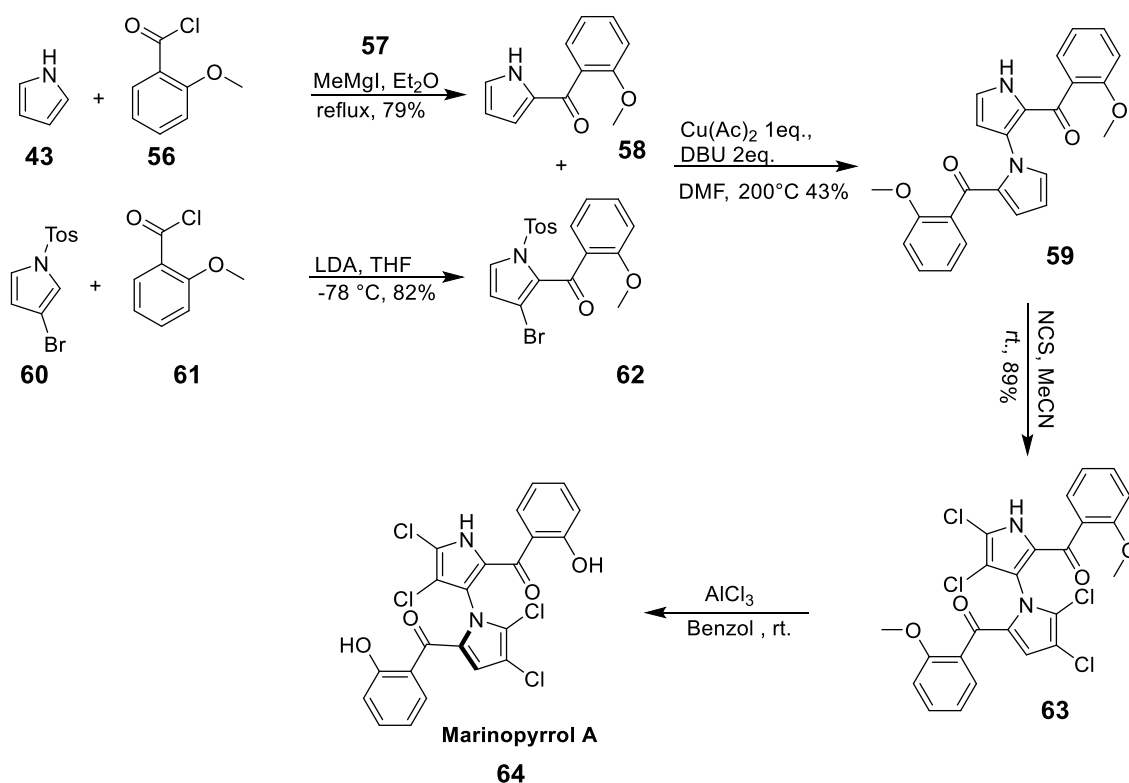


Abbildung 8: Pyrrolhaltige Naturstoffe.^[35]

Die Biosynthese ist für einige dieser Verbindungen noch nicht endgültig geklärt, jedoch kommen als Edukte mehrere Verbindungen in Frage. Die Aminosäure Prolin wird nach Aktivierung an das Protein PFP (*peptidyl carrier protein*) gebunden und in mehreren Schritten zu einem Pyrrolcarboxythioester oxidiert. Diese Einheit ist die Basis für die Bildung einiger Naturstoffe; darunter sind: Pyrrolostatin, Oroidin, Clorobiocin und Pyoluteorin. Einige dieser Pyrrol- und Halopyrrolverbindungen werden von marinen Lebensformen gebildet. Durch die höchst interessanten pharmakologischen und medizinischen

Eigenschaften einiger dieser Naturstoffe nimmt die Synthese dieser Stoffe eine immer wichtigere Rolle ein. Neben den bekannten Namensreaktionen zur Darstellung von Pyrrolen, wie *Knorr*, *Paal-Knorr*, *Hantzsch* sowie *Piloty-Robinson*, stellen Reaktionen zur gezielten Substitution ein wichtiges Werkzeug der Synthese von pyrrolhaltigen Naturstoffen dar.^[36a-c,37,36d-f] Ein gutes Beispiel für die gezielte N-Arylierung von Pyrrolen ist die von Kanakis *et al.* beschriebene Synthese von Marinopyrrol A (Schema 6).^[38,39]



Schema 6: Synthese von Marinopyrrol A nach Kanakis *et al.*^[38]

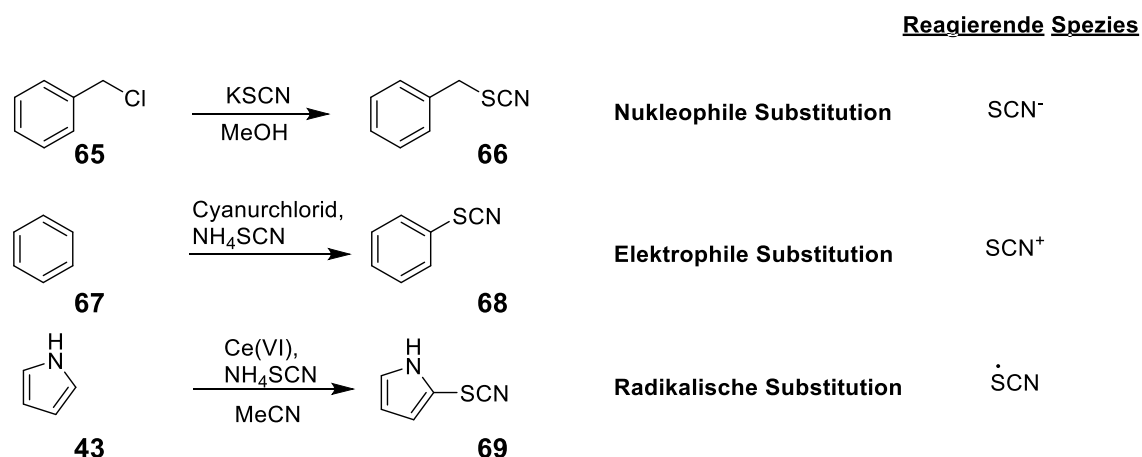
1.6 Organische Thiocyanate

Organische Thiocyanate waren nicht nur lange Zeit effiziente Insektizide, gegen die keine bekannte Spezies Resistenzen entwickelte (Abb. 9), sondern sie sind auch heute noch als Intermediate in der organischen Chemie von besonderer Nützlichkeit und erlauben Zugang zu verschiedensten schwefelhaltigen Verbindungen.^[40] Aufgrund der Eigenschaften der X-CN-Verbindungen werden sie häufig auch als Pseudohalogenide bezeichnet. Erste thiocyanathaltige Wirkstoffe sind schon seit fast 100 Jahren bekannt, allerdings wird erst seit der jüngeren Vergangenheit wieder intensiver an ihnen geforscht, da viele einfache und sichere Verfahren zu ihrer Synthese entwickelt wurden.^[41] Es gibt zu ihrer Darstellung mehrere Möglichkeiten, von denen die Grundzüge dieser Methoden in Schema 14 abgebildet sind. Interessant ist hierbei, dass nicht das thermodynamisch stabilere Isothiocyanat das Hauptprodukt ist, sondern, sofern es gebildet wird, lediglich das Nebenprodukt darstellt. Nur hohe Temperaturen erlauben die Isolierung von Isothiocyanaten, da die Nukleophilie des Schwefels gegenüber jener des Stickstoffes höher ist.^[42]



Abbildung 9: Werbung für Thanite (Insektizid auf Thiocyanatbasis) (Hercules Incorporated. “Advertisement for Hercules Thanite Insecticide.” 1944 *Hercules Advertisements*, 1944. Records of Hercules Incorporated, Volume 1944. Science History Institute. Philadelphia.).

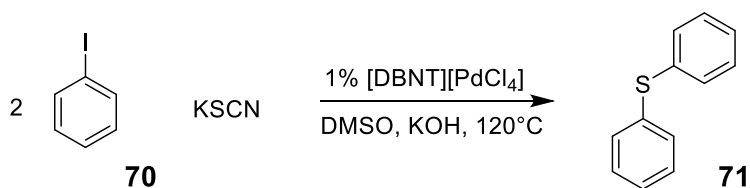
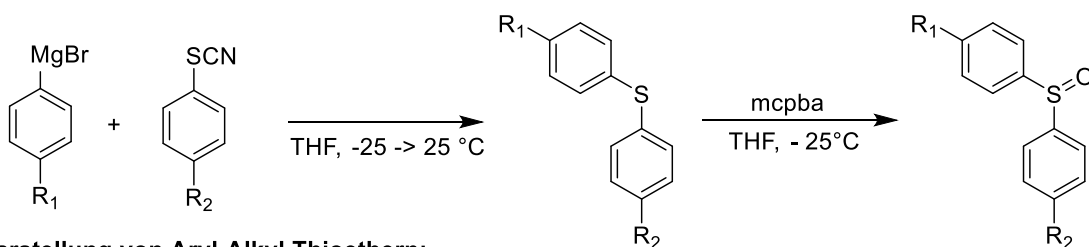
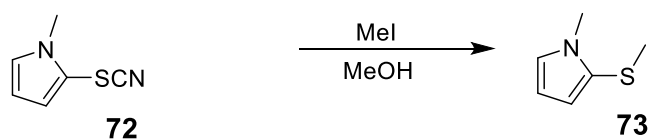
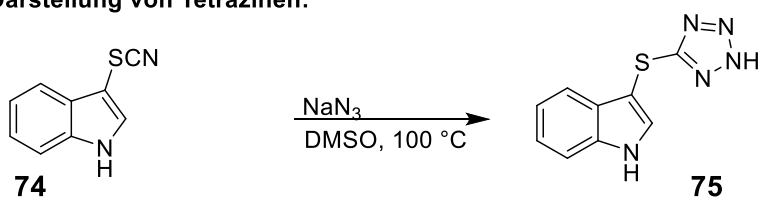
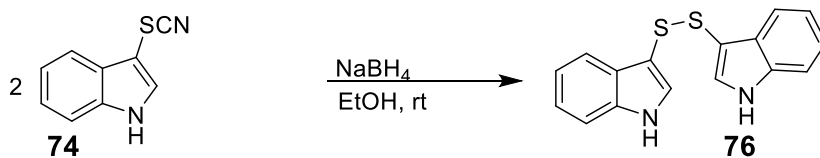
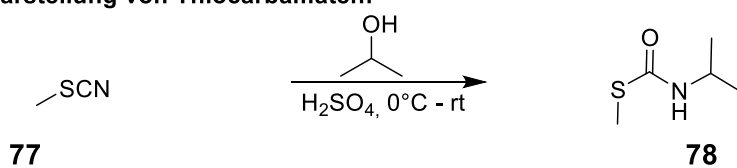
Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurde eine Vielzahl von Methoden zur Substitution an Aromaten zur Einführung von Thiocyanato-Gruppen entwickelt (Schema 7). Die während dieser Arbeit am häufigsten genutzten sind die Methoden von Yadav *et al.* sowie von Wu *et al.*, wobei Iod oder Oxone als Oxidationsmittel in Methanol als Lösungsmittel eingesetzt werden. Jedoch ist nicht jede Methode für alle denkbaren Substrate geeignet.^[43–45]



Schema 7: Mögliche Methoden zur Darstellung von Thiocyanaten.^[42]

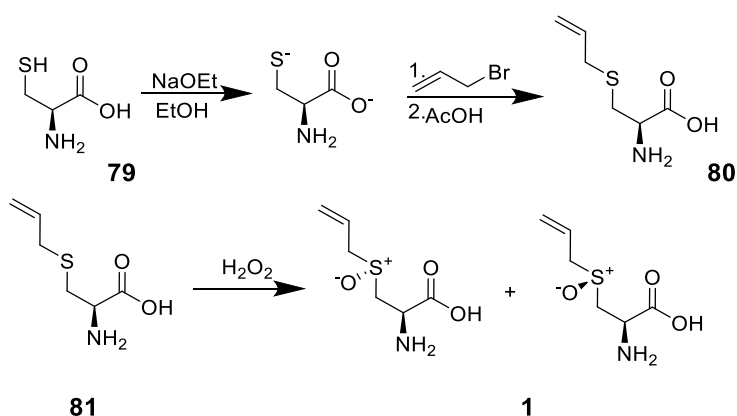
Alternativ zu diesen Methoden können auch Thiole, Thioether oder Disulfide oxidativ cyaniert werden.^[46] Die Anwendungsbereiche von Thiocyanaten sind vielfältig und nicht auf die Synthese von Tri- oder Tertrazolen beschränkt.^[47] Verwendungsbeispiele von Thiocyanaten aus dem Bereich der organischen Chemie sind in Abb. 8 gezeigt.^[48] Viele weitere Beispiele für die Synthese von heterocyclischen Verbindungen wie 1,3,4-Thiadiazole, 2-Iminobenzoxathiole, 2-Thioalkoxyoxazole oder auch Di-oder Tri-thiocarbonate sind aus der Literatur für die Umsetzungen von Thiocyanaten bekannt.^[49]

Thiocyanate sind auch in besonderer Weise geeignet Thiocarbamate darzustellen. Da diese spezielle Reaktion in stark azidem Medium stattfindet, wird sie Riemschneider-Reaktion genannt. Jedoch sind hierbei lediglich sekundäre sowie tertiäre Alkohole als „Alkylierungsreagenzien“ geeignet. Methanol oder Ethanol als Vertreter der primären Alkohole reagieren hierbei nicht.^[50]

Darstellung symetrischer Arylthioether:**Darstellung unsymetrischer Arylthioether sowie Sulfoxiden:****Darstellung von Aryl-Alkyl Thioethern:****Darstellung von Tetrazinen:****Darstellung von symetrischen Disulfiden:****Darstellung von Thiocarbamaten:**Abbildung 10: Applikationen von Thiocyanaten in der organischen Chemie.^[50,42]

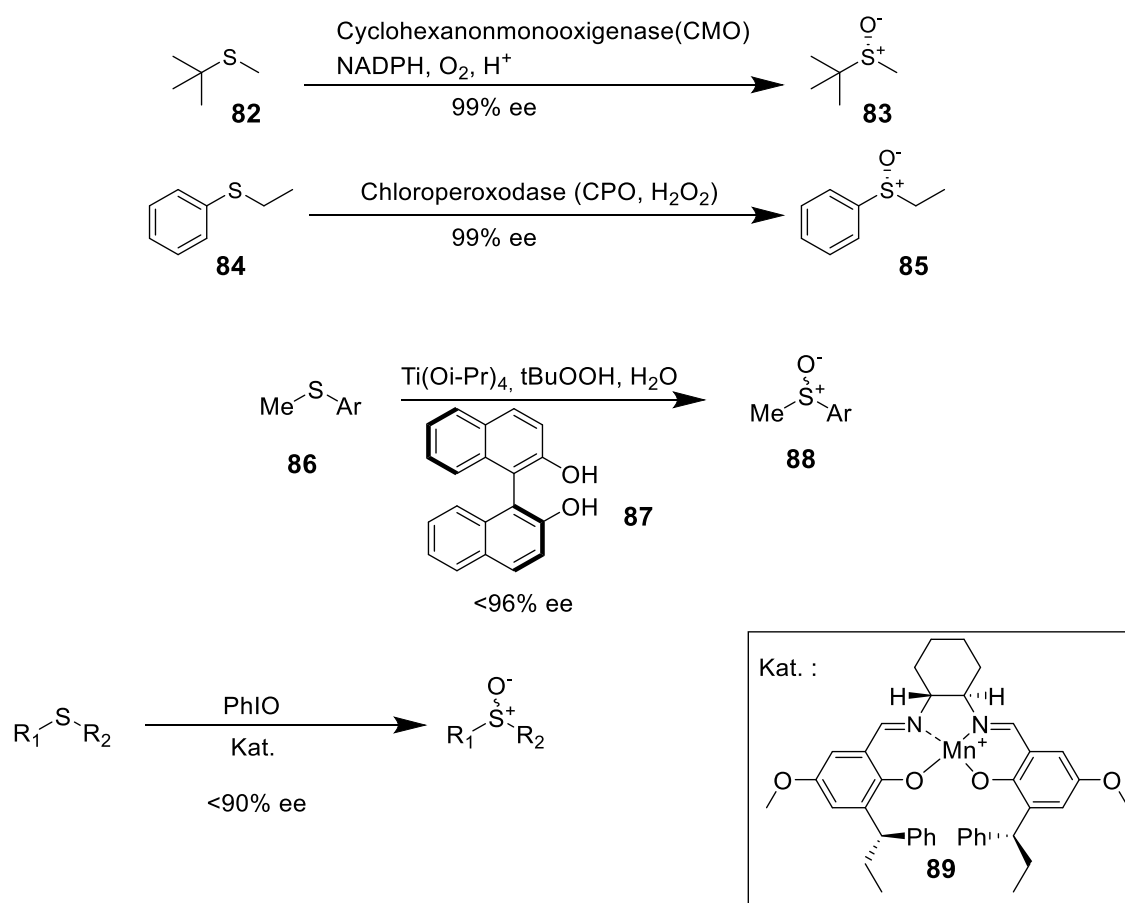
1.7 Methoden zur Synthese

Die erste Charakterisierung und Synthese von Organoschwefelverbindungen aus *Allium*-Arten gelangten Stoll und Seebeck bereits 1948 bzw. 1951. Sie erkannten, dass in *Allium sativum* Alliin enthalten ist und das Substrat eines Enzyms (Allinase) ist.^[13,51] Die ersten Synthesen von Cysteinsulfoxiden, ausgehend von den Sulfiden, waren nur in sehr geringem Umfang durch die Induktion des stereogenen Zentrums am C-Atom der Aminogruppe des Cysteins stereoselektiv. Die geläufigste Methode zur Synthese aliphatischer CSO's ist bis dato die Umsetzung von Cystein mit 2 Äquivalenten einer starken Base zur Deprotonierung des Thiols. Im zweiten Schritt der Reaktion wird nun das Dianion mit einem Alk(en)yl-Halogenid umgesetzt. Die Ausbeuten an S-Alk(en)yl-Cysteinen sind hierbei fast quantitativ. Das so erhaltene Produkt kann nun mit Oxidationsmitteln zum CSO oxidiert werden. Wasserstoffperoxid liefert hierbei ein Gemisch der beiden Stereoisomere, die durch fraktionierte Kristallisation getrennt werden können (Schema 8).^[52]



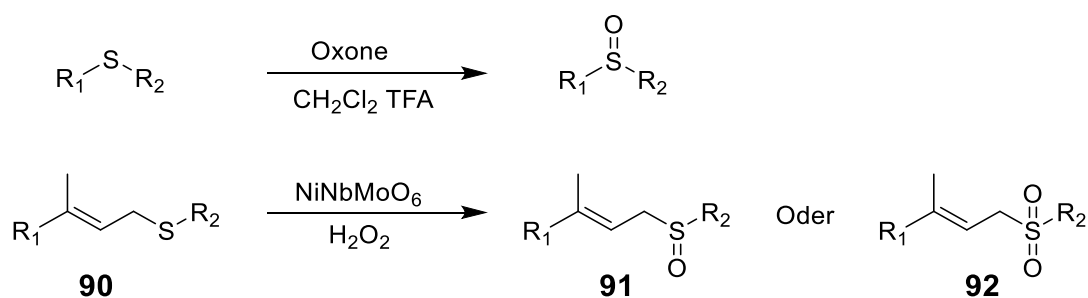
Schema 8: Synthese von Alliin.^[13]

Mittlerweile stehen eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung, um eine stereoselektive Oxidation des Schwefelatoms durchzuführen, sowohl durch Ganzzellkatalyse, enzymkatalytisch, durch Übergangsmetallkatalyse (Schema 9) oder chirale Oxidationsmittel, wie Persäuren. Einige dieser Methoden wurden von Koch und Keusgen für die asymmetrische Oxidation des Schwefels in S-Allyl-Cystein verwendet.^[53]



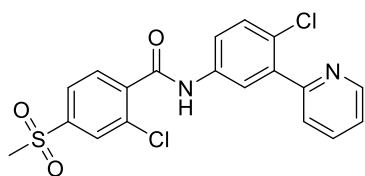
Schema 9: Methoden der asymmetrischen Oxidation an Schwefel-Atomen.^[53]

Trotz der Möglichkeit der asymmetrischen Oxidation spielen eher konventionelle Methoden, aufgrund ihrer höheren Flexibilität, Ökonomie und des geringeren Aufwands, eine erhebliche Rolle, sowohl im Labor als auch in der Industrie.^[54] Aktuelle Methoden verwenden als Oxidationsmittel zum Beispiel Oxone[®], welches sich vor allem für unproblematische Substrate eignet. Für allylische Substrate jedoch kommt als ökonomisches Oxidationsmittel vor allem H₂O₂ in Betracht, dessen Reaktivität durch diverse Metalloxid-Katalysatoren gesteigert werden kann.^[55] So verwendeten Choi et al. LiNbMoO₆ für die Oxidation von allylischen Sulfiden (Schema 10.).^[56]

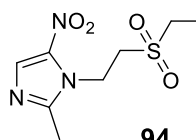


Schema 10: Moderne, nicht stereoselektive Oxidations-Methoden.^[56,55]

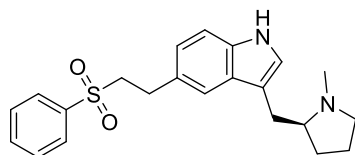
In der Medizin bzw. Pharmazie zählen Wirkstoffe, die eine Sulfoxidstruktur oder ein Sulfon enthalten, zu den absatzstärksten. Einige Beispiele sulfoxidhaltiger oder sulfonhaltiger Wirkstoffe sind in Abbildung 10 dargestellt.^[57] So kommen Sulfoxide nicht nur in einem Teilbereich der Medikamente, sondern auch in vielen wichtigen Arzneistoffen vor.



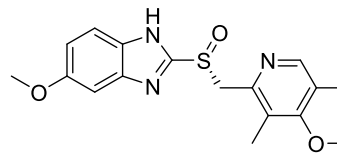
Erivrdge (anti Tumor) 93



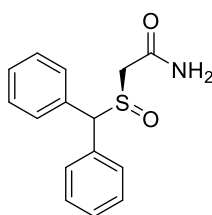
Tinidazol (Antiinfektivum) 94



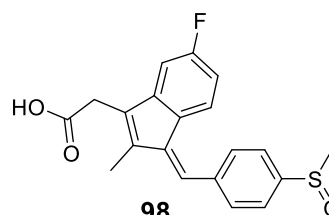
Eletriptan (Migräne) 95



Esomeprazol (Protonenpumpen Inhibitor) 96



R-Modafinil (Psychostimulanz) 97



Sulindac (NSAID) 98

Abbildung 11: Verschiedene sulfoxid- und sulfonhaltige Wirkstoffe.

Aliphatische CSO's sind synthetisch von geringerem Anspruch als die aromatischen Cysteinsulfoxide, wie 2-Pyridylcysteinsulfoxid und 2-Pyrrolylcysteinsulfoxid. Ihre Synthese ist Gegenstand aktueller Forschung. Hierbei können als Ausgangsstoffe das Thiol des Aromaten sowie ein geschütztes Chloralanin verwendet werden. Für Pyridinderivate

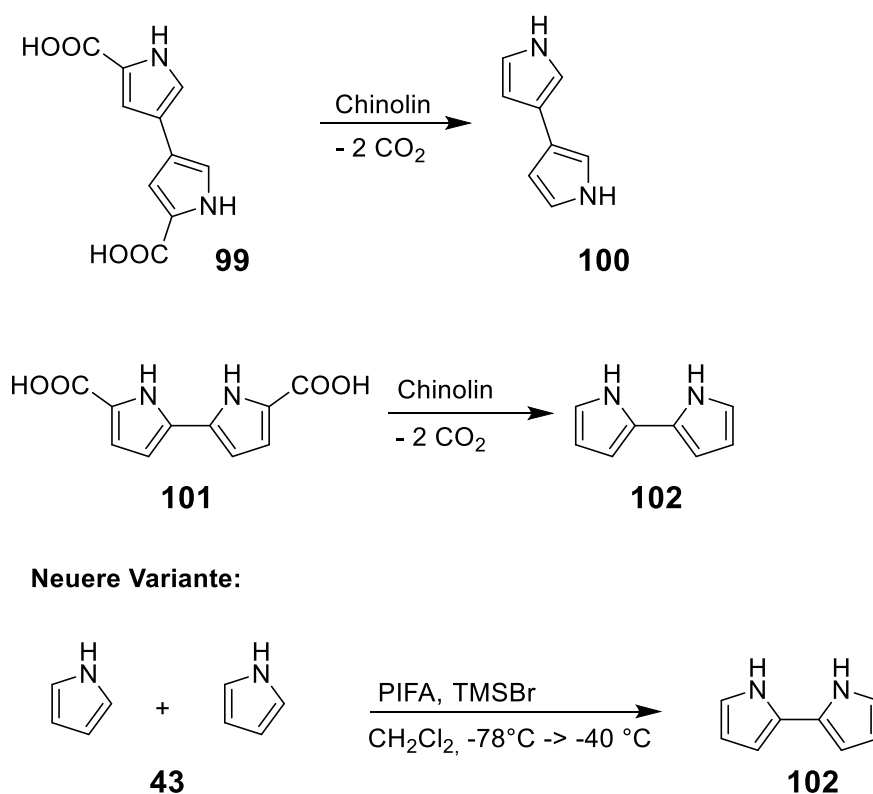
funktioniert diese Methode gut; allerdings sind Pyrrolthiole sehr instabil und können teilweise nicht isoliert werden, sodass ihre Eignung als Ausgangsstoff für weitere Umsetzungen daher gering ist.

Naturstoffe aus *Allium*-Arten, die aus Pyrrol-CSO gebildet werden, können dementsprechend nicht einfach durch Umsetzung des synthetischen Cysteinsulfoxids gewonnen werden.

Um diesen Verbindungen in ausreichendem Maße für weitergehende Charakterisierungen und *Screenings* ihrer biologischen Aktivität habhaft zu werden, muss somit eine andere Möglichkeit der Darstellung gefunden werden. Für verschiedenste Aromakomponenten aus *Allium*-Spezies, besonders *Allium sativum*, wurden bereits Synthesen entwickelt und die biologischen Vorgänge, die zur Bildung der sekundären Stoffwechselverbindungen führen, untersucht, wobei besonders Block *et al.* als Pioniere der Synthese von Verbindungen aus *A. sativum* und *A. cepa* hervortreten.^[58]

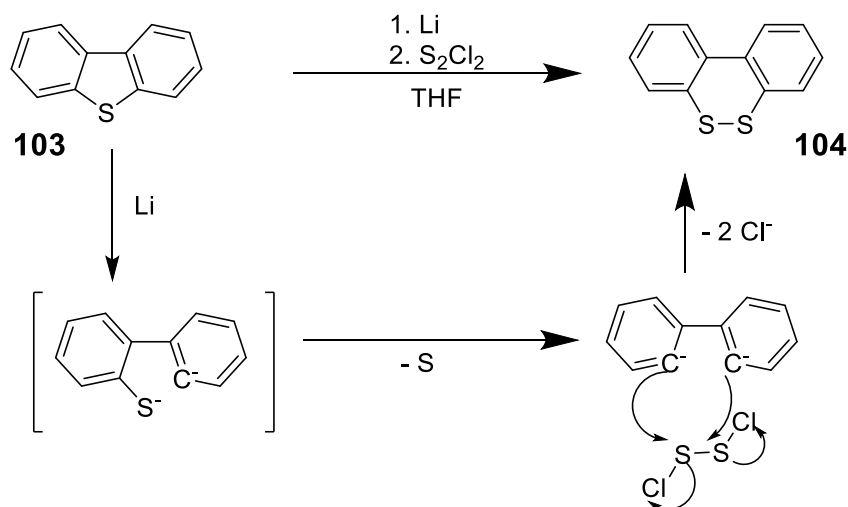
1.7.1 Bipyrrrole und Dithiine

Bipyrrrole sind eine Klasse von Verbindungen, die aufgrund ihrer recht geringen Stabilität und ihrer ausgeprägten Neigung zur Polymerisation zu den aktuellen Forschungsgebieten der Naturwissenschaften zählen, insbesondere bei der Darstellung von Tetrapyrrolverbindungen, wie Porphyrine. Sie könnten auch als Ausgangsverbindung für die Synthese des roten Farbstoffes aus *Allium* verwendet werden. Nach Farnier *et al.* lassen sich die Bipyrrrole durch Decarboxylierung ihrer Dicarbonsäuren darstellen. Neuere Varianten mit hypervalenten Iodverbindungen liefern jedoch bessere Ausbeuten bei nur einem Schritt und bei einem wesentlich geringeren Zeitaufwand (Schema 11).^[59–61]



Schema 11: Synthese der 2,2'- und 3,3'-Bipyrrrolen.^[60,61]

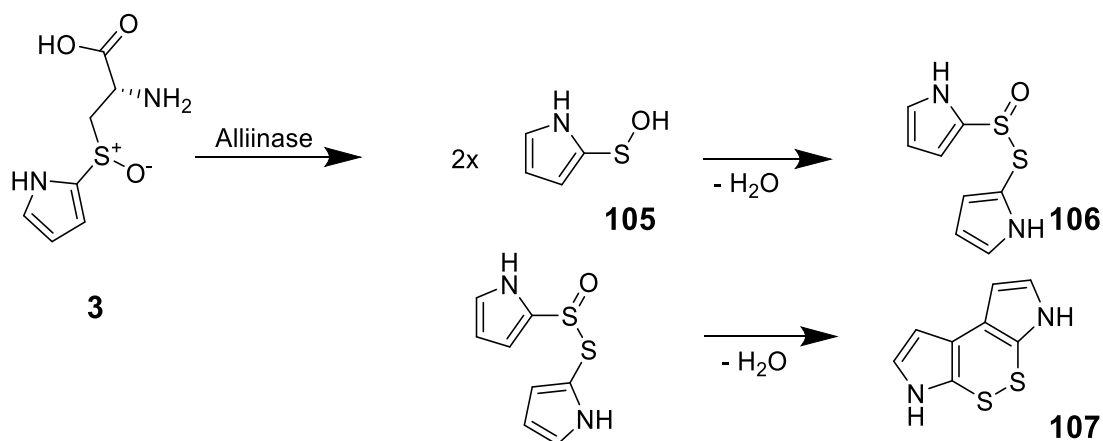
Die Arbeiten von Cossu *et al.* belegen die Verwendung von Thiophenderivaten zur Synthese von Dibenzo- sowie Dinaphtodithiolen (Schema 12). Der Mechanismus involviert die Bildung eines Dianions, welches die eigentliche reaktive Spezies darstellen soll. Widersprüchlich ist jedoch, dass auch die Verwendung von S₂Cl₂ in dieser Reaktion zum gewünschten Produkt führt. Zurückzuführen ist dies nach Cossu *et al.* auf die Instabilität des Trisulfids, das unter Schwefelextusion das Produkt bildet.^[62]



Schema 12: Synthese von Diaryl[1,2]dithiinen.^[62]

Eine kristallographische Charakterisierung dieser Verbindungen zeigte, dass sie nicht vollständig planar sind, sondern eine gewinkelte S-S Bindung aufweisen. Dementsprechend sind diese Verbindungen nicht als Aromaten aufzufassen.

Nach Kucerová *et al.* bildet sich der rote Farbstoff unter Kondensation aus dem Pyrrol-2-yl-pyrrol-2-sulfinothioat, das aus der Kondensation von 2 Molekülen der 2-Pyrrolsulfensäure gebildet wird (Schema 13).^[63]



Schema 13: Bildung des roten Farbstoffes nach Kucerová *et al.*^[63]

Aufgrund der hohen Reaktivität der Sulfensäuren sowie der gut erforschten Aktivität der Allinasen lässt dies den Schluss zu, dass es sich bei der Cyclisierung unter Kondensation

der Thiosulfinat-Spezies um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dieser Reaktion handelt.

1.8 Natürliche Polysaccharide

Natürlich Polysaccharide stammen aus einer Vielzahl biologischer Quellen wie Algen, Pilzen, Pflanzen oder auch Mikroorganismen wie Bakterien oder Archaeen. Generell handelt es sich hierbei um Biopolymere, welche sich durch glycosidische Bindung von mehreren Monosacchariden, wie z.B. Glucose, Mannose oder Fructose, bilden. Es finden sich sowohl lineare als auch verzweigte Strukturen, deren generelle Formel mit $(C_6H_{10}O_5)_n$ wiedergegeben werden kann. Bei n handelt es sich um die Anzahl der Wiederholungen dieser Monomer-Einheit. Die Anzahl hierbei ist für verschiedene Polysaccharide stark unterschiedlich und reicht von unter 40 bis über 4000 Einheiten.^[64] Auch innerhalb eines Typus von Polysaccharid und sogar innerhalb eines Organismus sind Schwankungen im Bereich der Kettenlänge samt des Verzweigungsgrades zu erwarten. Weitere Typen von Polysacchariden stellen Verbindungen mit Aminozuckern oder carboxymethylierten Zuckern als Monomer dar (Tabelle 2). Es handelt sich somit um ein höchst diverses Feld der Makromoleküle, die in der Natur verschiedene Funktionen haben.

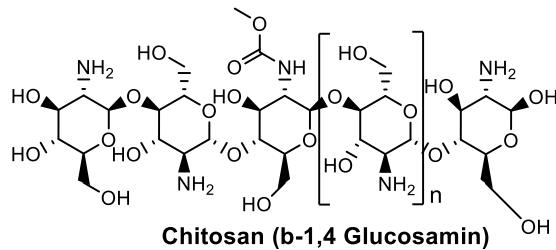
Tabelle 2: Verschiedene Polysaccharide und ihre funktionellen Gruppen.

Charakter	Polysaccharid	Funktionelle Gruppen	Refs.
neutral	Pullulan	OH	Heinze <i>et al.</i> 2006 ^[65]
neutral	Dextran	OH	Singh <i>et al.</i> 2008 ^[66]
neutral	Stärke	OH	Le Corre <i>et al.</i> 2010 ^[67]
anionisch	Alginat	OH, COO ⁻	Augst <i>et al.</i> 2006 ^[68]
anionisch	Hyaluronsäure	OH, COO ⁻	Weissmann <i>et al.</i> 1954 ^[69]
kationisch	Chitosan	OH, NH ₃ ⁺	Rinaudo 2006 ^[70]

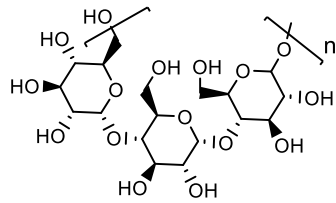
So sind Stärke oder Glykogen sowie Fructane Energiespeicher für Pflanzen; Zellulose oder Chitin hingegen tragen zur strukturellen Integrität des jeweiligen Organismus bei.^[71] Polysaccharide sowie davon abgeleitete Verbindungen nehmen auch auf Signalerkennung, das Immunsystem, die Blutgerinnung oder auch die Fruchtbarkeit Einfluss.

Die Verwendung dieser Biomakromoleküle ist außerordentlich vielseitig. So werden Polysaccharide für Bekleidung, Verpackung, als Nahrungsergänzungsmittel oder Nahrungsmittelzusätze eingesetzt. Des Weiteren spielen sie eine immer wichtigere Rolle bei der Herstellung von Arzneistoffen bzw. ihrer gezielten Freisetzung oder auch selbst als Arzneimittelprodukt.^{[72][73]} Eine weitere Rolle in der Industrie fällt Polysaccharide bei der Behandlung von Abwässern zu, wo sie eine Alternative zu klassischen Ionentauschern darstellen könnten.^[74]

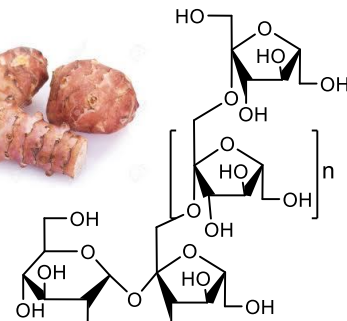
Es wurde hierbei insbesondere die Rolle der in dieser Arbeit genutzten Polysaccharide (Dextran, Pullulan, Arabinogalactan) bzw. Fructane (Inulin) (Abb. 11 und 12) betrachtet.



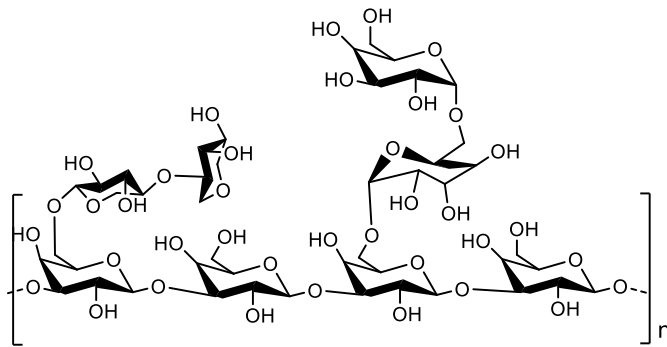
Chitosan (b-1,4 Glucosamin)



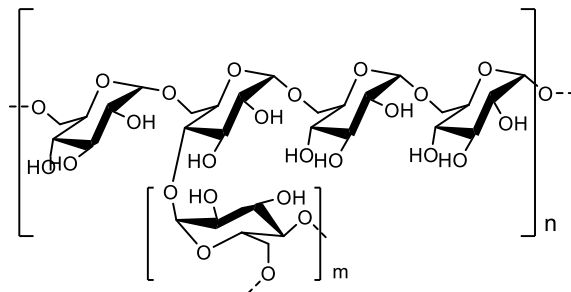
Pullulan (a-1,6 Maltotriose)



Inulin (Fructose)



Arabinogalactan (b-1,3 + a-1,6-Galactose; a-1,3 Arabinose)



Dextran (a-1,4 + a-1,6 Glucose)



Abbildung 12: Verschiedene ausgewählte Polysaccharide (Ferlac Leuc. Quelle: <https://ferment9.com/product/abiasa-leuconostoc-mesenteroides-vegano>; am 10.10.2019, um 13.23.).

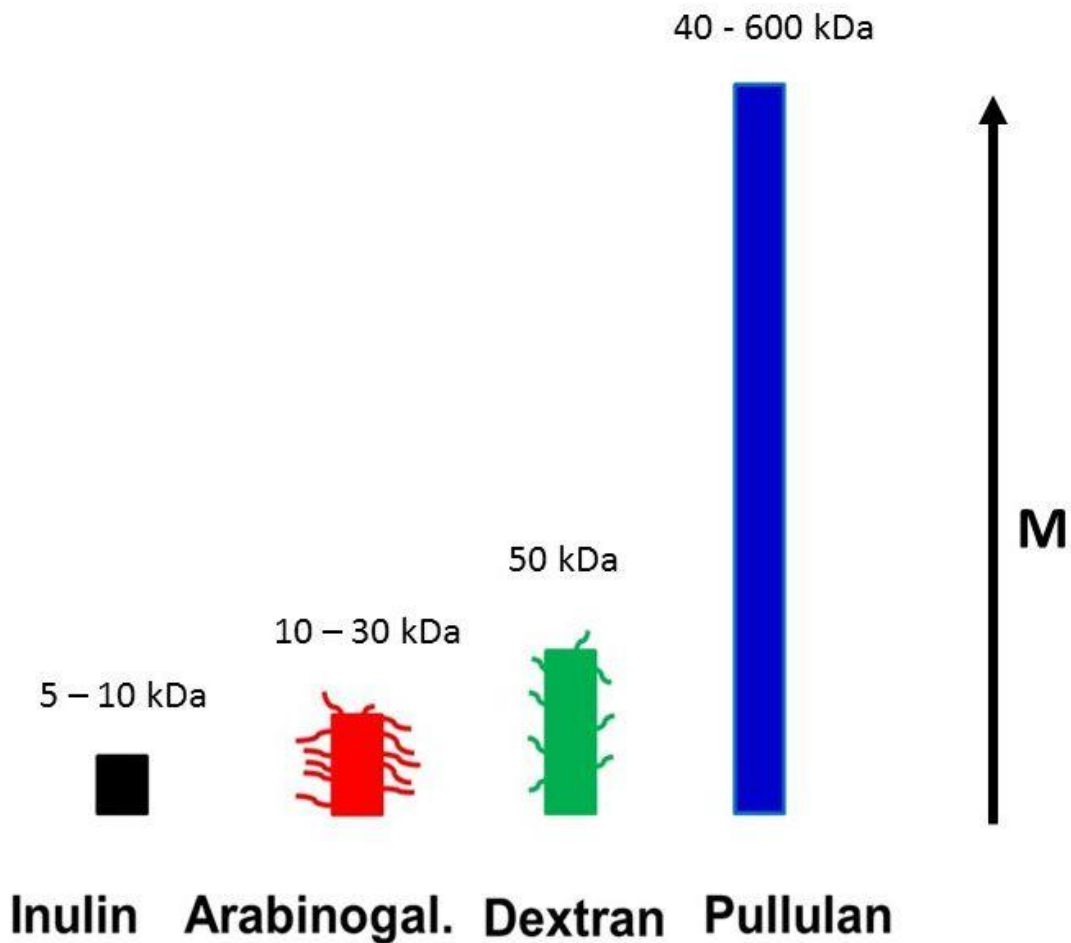


Abbildung 13: Vergleich der Molmassen sowie des Verzweigungsgrad der in dieser Arbeit verwendeten Polysaccharide (nicht maßstabsgetreu).

Pullulan wird von hefeähnlichen Pilzen der Gattung *Aureobasidium* aus Zucker sowie Stärke hergestellt. Es besteht aus Maltotriosen als "Monomereinheiten", welche über α -1,6-glycosidische Bindungen verbunden sind. Es handelt sich um eine wasserlösliche Verbindung, die vom Menschen nicht verstoffwechselt werden kann. Die Molekularmasse reicht von ca. 40 kDa bis über 600 kDa. Wegen der speziellen Verknüpfung über α -1,4 und α -1,6 glycosidische Bindungen besitzt das Pullulan interessante Eigenschaften. So vermag Pullulan Sauerstoff-undurchlässige Filme zu bilden und zeigt eine starke Adhäsion an verschiedene Oberflächen. Eingesetzt wird es in der Lebensmittelindustrie als Füllstoff, Bindemittel oder Ersatz für Stärke. Pullulan ist vielseitig funktionalisierbar; über 30 verschiedene Modifikationen wie Methylierungen oder Carboxymethylierungen sind literaturbekannt, was es zu einem vielseitig einsetzbaren Material macht. Pullulan-

microsphenen bilden die Basis von Versuchen, diese als Träger von verschiedenen Arzneimitteln zu verwenden; Pullulan (kationisch modifiziert) als Träger kann auch für die gezielte Leberzelltherapie oder von Antikrebsmedikamenten genutzt werden.^[75]

Inulin gehört mit bis zu 100 Monomereinheiten zu den Fructanen. Es kommt in verschiedenen Pflanzen wie Topinambur oder auch Zichorienwurzel und, ähnlich dem Pullulan in der Nahrungsmittelindustrie, als Zusatzstoff in verschiedensten Waren eingesetzt. Des Weiteren kommt Inulin als Immunomodulator in Betracht.^[76] Es sind verschiedene Modifikationen wie Carboxymethylierung, vergleichbar mit dem Pullulan, bekannt.^[77] Die Anwendungen überschneiden sich, sodass sich auch Inulin als Trägermaterial für Wirkstoffe eignet.^[78]

Arabinogalactan gilt als Ballaststoff der menschlichen Ernährung und ist ein stark verzweigtes Polysaccharid, das aus Galactose und Arabinose als Monomeren besteht.^[79] Unter anderem kann dieses aus Lärchen gewonnen werden, kommt aber auch zum Beispiel in *Gummi arabicum* vor. Arabinogalactan assoziierte Proteine (AGPs) kommen in fast allen Pflanzen vor und spielen eine wichtige Rolle bei deren Entwicklung. Von AGPs werden vielfältige Funktionen der Pflanze beeinflusst, beispielsweise Fruchtbarkeit und Wachstum. Seine Anwendung in der Medizin ist den übrigen zuvor vorgestellten Verbindungen ähnlich und findet sich besonders im Bereich als Carrier für Wirkstoffe zur gezielten Behandlung der Leber. Auch die Wirkung als Immunomodulator wurde erforscht; es zeigte eine Eignung als Hilfsstoff bei Impfungen oder bei Erkältungen.^[80]

Dextran ist der wohl in der Biosensorik am häufigsten anzutreffende Vertreter der Polysaccharide. Bereits 1995 wurde von Löfas *et al* Dextran als Oberflächenmodifikation von Sensoroberflächen für die SPR etabliert.^[65,81] Ebenso in der Medizin wurden mit Dextran unterschiedlichste Studien durchgeführt, was es zum besten erforschten der hier vorgestellten Polysacchariden macht.^[82] In verschiedenen Studien konnte die vielseitige Einsetzbarkeit dieses Makromoleküls, als beispielsweise Trägersystem für Medikamente, Wirkstoff in Blutersatzstoffen sowie Heparinersatzstoff, belegt werden.^[83]

1.9 HPLC-Analytik

Die HPLC-Analytik (*High Performance Liquid Chromatography*) wird zur Trennung sowie zur Analyse von Substanzen verwendet. Die Apparatur besteht aus einer Pumpe, einem oder auch mehreren Fließmittelreservoirs, einem Injektionsport für Proben, der HPLC-Trennsäule sowie einem Detektor. Das Gemisch von Verbindungen der Probe wird in der Trennsäule durch verschiedene Wechselwirkungen der Verbindungen mit dem Säulenmaterial aufgetrennt. In der Trennsäule befindet sich zumeist die apolare stationäre Phase, „Kieselgel C18“; jedoch sind viele verschieden funktionalisierte Kieselgele käuflich zu erwerben. In dieser Arbeit wurde im Bereich der Naturstoffanalytik von Pyrrol-Carbonsäuren eine Aminophase sowohl analytisch als auch präparativ eingesetzt.^[84] Die Trennwirkung dieser Säulentypen beruht auf der Wechselwirkung polarer Gruppen wie -OH, -COOH, -COH, mit den Aminogruppen des Säulenmaterials und ist somit eher der Normalphasen und weniger der Umkehrphase zuzuordnen (Abb. 8).^[85]

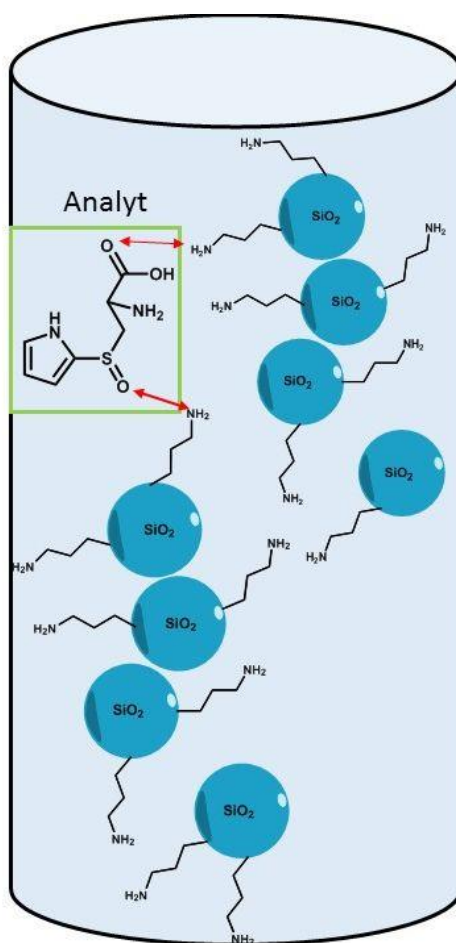
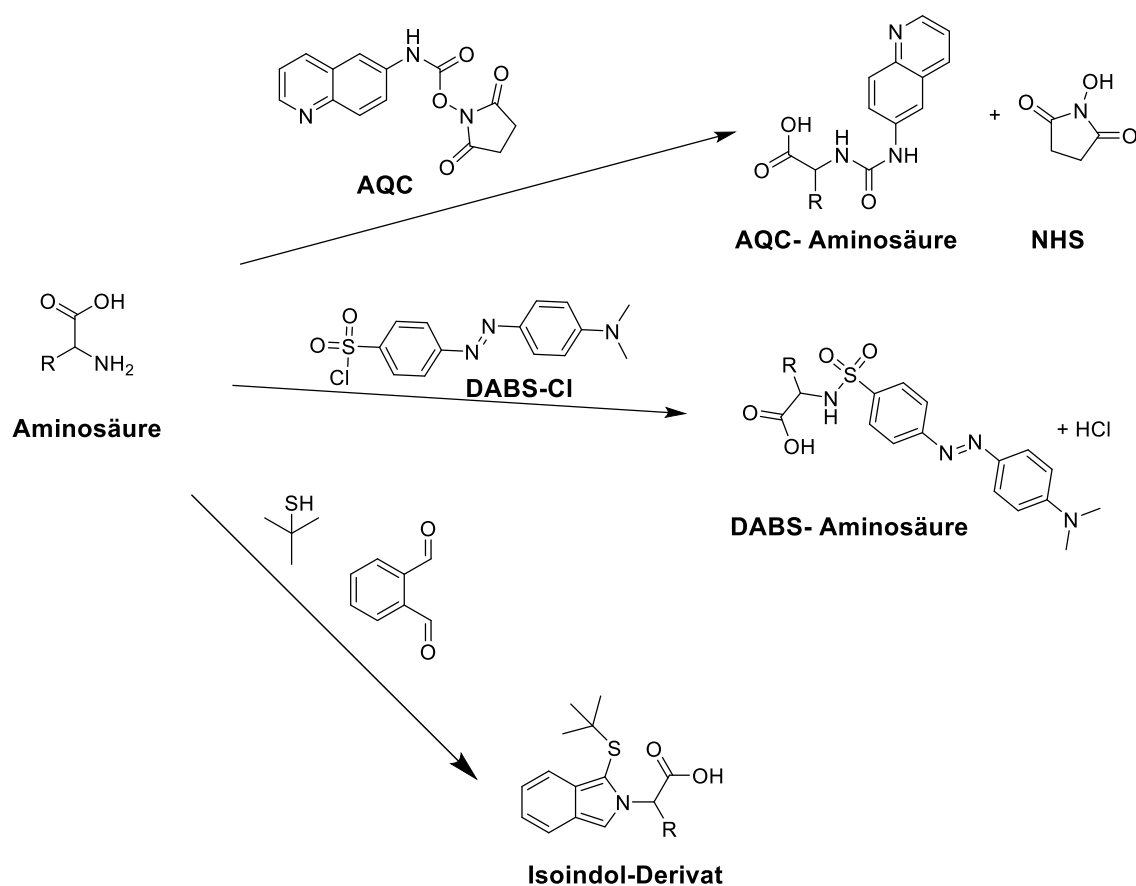


Abbildung 14: Darstellung einer Aminophase.

Die Stärke der Wechselwirkung einer Substanz entscheidet darüber, wie schnell die Substanz mit dem Fließmittel (mobile Phase) von der Säule eluiert wird. Die Trennung unterschiedlicher Verbindungen erfolgt durch die sich unterscheidenden Wechselwirkungscharakteristika der Substanzen. Die Steuerung der Retentionszeiten geschieht durch die Methode und Zusammensetzung der mobilen Phase, z.B. einem Fließmittelgradienten oder einer isokratischen Fließmittelzusammensetzung (bei konstanter Flussrate und Säulentyp). Die Detektion erfolgt mittels UV/VIS-Detektor, Fluoreszenz-Detektor oder bzw. auch massenspektrometrisch. Für stark polare Verbindungen wie Aminosäuren wurden verschiedene Derivatisierungsstrategien entwickelt, um eine empfindliche Detektion im UV-Bereich sowie die Nutzung von Umkehrphasen zu erreichen.^[86] Drei der am häufigsten genutzten Methoden sind in Schema 6 dargestellt.



Schema 14: Aminosäuren-Derivatisierung mittels AQC, DABS-Cl oder OPA.

Alle drei Methoden werden für die Vorsäulenderivatisierung genutzt und bieten eine fast quantitative Ausbeute an derivatisierten Aminosäuren, sofern das Derivatisierungsreagenz im Überschuss eingesetzt werden sollte. Falls underivatisierte Aminosäuren getrennt werden, sollte aufgrund des Fehlens eines stark UV-aktiven Chromophors auf alternative

Detektoren, wie Massen-Detektoren oder alternativ RI-Detektoren, zurückgegriffen werden.^[87]

1.10 SPR Analytik

Die Surface Plasmon Resonance (SPR) erlaubt die Interaktions-Betrachtung von Molekülen in Echtzeit. Dabei wird die Änderung des Brechungsindexes gemessen. Das Grundphänomen ist hierbei die Anregung von Oberflächenplasmonen bzw. Plasmonen, die kollektiven Schwingungen der Elektronen aus dem Leitungsband eines Metalls. Es kann eine starke Lokalisierung dieser Wellen an der Oberfläche stattfinden, die sich dann parallel zur Oberfläche ausbreiten. Diese Schwingungen sind an elektromagnetischen Wellen gekoppelt, was zur Folge hat, dass sie sich entlang der Grenzfläche zwischen dem Metall und einem Dielektrikum fortpflanzen; sie werden Oberflächenplasmonen genannt.^[88] Der Effekt ist in seiner Ausdehnung begrenzt, weshalb nur Interaktionen in einem gewissen Bereich über der Metalloberfläche registriert werden können, da das evaneszente Feld (EF) exponentiell mit dem Abstand abfällt (Abb. 13).^[89] Was die Instrumentalisierung angeht, so sind zwei verschiedene Konfigurationen beschrieben, die *Otto*- und die *Kretschmann*-Konfiguration, welche sich durch die Anordnung des Prismas unterscheiden, obgleich bei der *Otto*-Anordnung ein Luftspalt zwischen Prisma und Metallschicht vorhanden ist. In Abbildung 13 ist ein vereinfachter Aufbau eines SPR-Gerätes mit *Kretschmann*-Anordnung abgebildet.

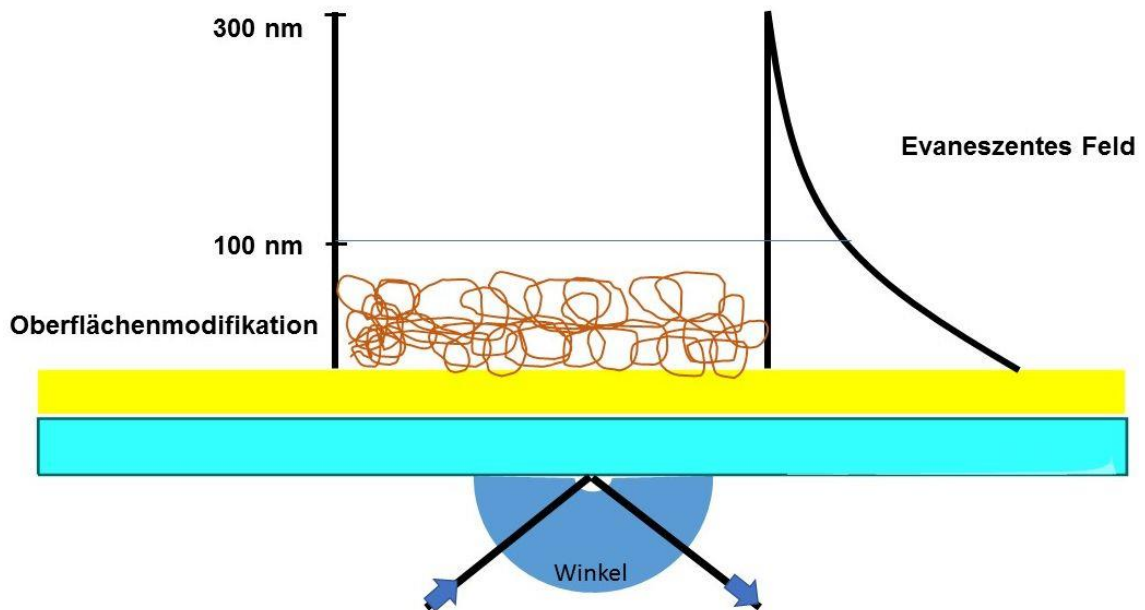


Abbildung 15: Abnahme des evaneszenten Feldes in Abhängigkeit zur Entfernung.

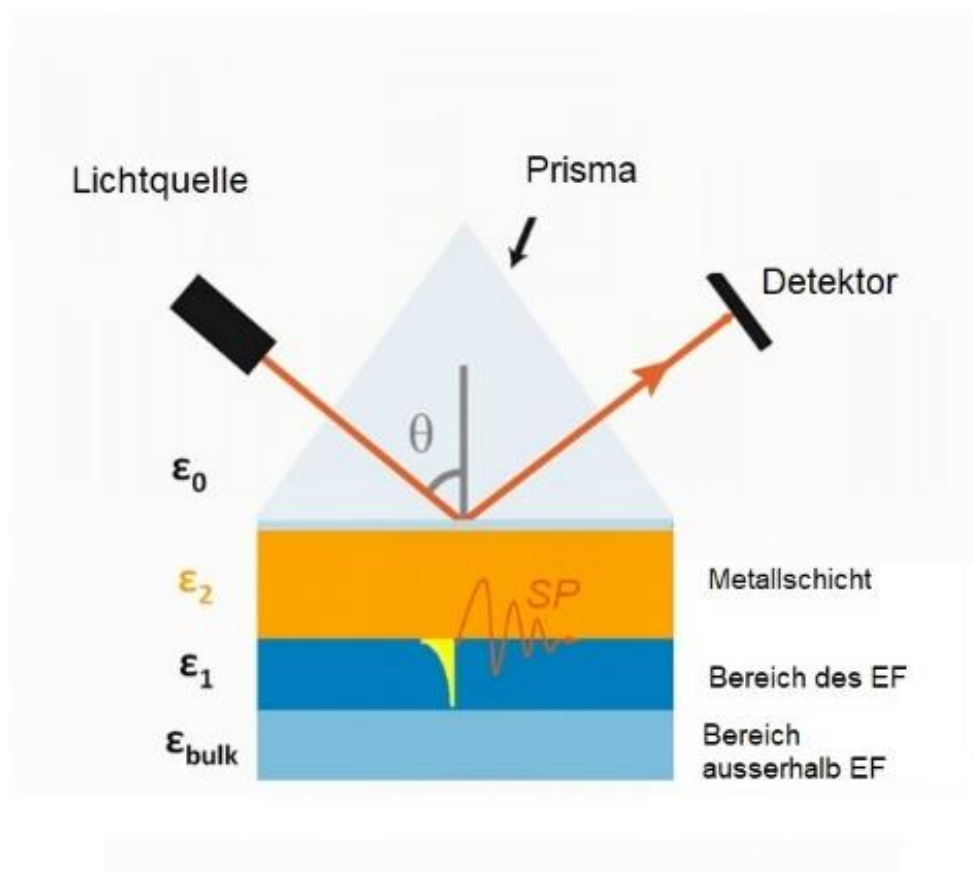


Abbildung 16: Kretschmann SPR Geometrie.

Bereits 1983 konnten durch Liedberg *et al.* die Interaktion von Biomolekülen mittels SPR gezeigt werden.^[90] Durch stetige Weiterentwicklung und großer Fortschritte der Mikroprozessoren und Halbleitertechnik der letzten Jahrzehnte sind SPR-Geräte wesentlich leistungsfähiger geworden. Neueste Forschung aus dem Bereich SPR-Analytik umfasst unter anderem Rezeptor Ligand-Interaktionen und den sich daraus ergebenden Mechanismus der Aktivierung des Interleukin-36-Pfades.^[91] Andere aktuelle Themen sind die Entwicklung von neuen Oberflächenstrukturen, welche die gezielte Analytik eines Zielmoleküls bzw. einer Molekülfamilie in einer natürlichen Matrix erlauben. Ein Beispiel hierfür ist die von Wang *et al.* publizierte Entwicklung eines Aptasensors für die Analytik von Tetracyclinen in Honig.^[92] Die aktuelle Bedeutung der SPR für klinische Anwendungen ist in Tabelle 2 dargestellt.^[93]

Tabelle 3: Klinische Anwendungen der SPR-Analytik.

Plattform	Target	Ligand	Vorteile	Matrix
SPR	Anti-Dengue IgM	Dengue-Virus-Serotypen	Schnell (10 Min.), 1 µL Lösung.	Serum ^[94]
SPR	Anti-PA IgG	PA des Anthrax Toxins	Einfache Optik und Mechanik; Günstig.	Puffer ^[95]
SPRi	Anti-EGFR IgG	Membran gebundenes EGFR	Direkte Kinetik ohne Labeling	Puffer ^[96]
SPRi	hCG; ALCAM	Anti-hCG IgG Anti-ALCAM IgG	LOD: 45 ng/mL; einfache Optik und Mechanik.	Plasma ^[97]
LSPR	Amyloid-beta-derived diffusile ligand (ADDL)	Anti-ADDL IgG	LOD: 20 pM labelfrei; hoher Durchsatz; hochselektiv.	Cerebro-spinale-Flüssigkeit ^[98]

1.11 Oberflächenentwicklung für die SPR-Analytik und Biosensorik

Durch die Möglichkeit innerhalb des Arbeitskreis Keusgen die SPR-Analytik nutzen zu können, wurde in Kooperation mit Dr. Doru Vornicescu ein Projekt gestartet, um eine neuartige Oberflächenplattform für die SPR-Analytik zu entwickeln. Proteininteraktionen bzw. Protein-Molekül-Wechselwirkungen stellen einen wichtigen Bestandteil der Bioanalytik dar. Ein erster wichtiger Schritt zur Entwicklung eines Biosensors nimmt die Immobilisierung von Biomolekülen ein.^[99] Es wurden bereits etablierte Assays wie Lektin/ Zucker-Bindungsstudien verwendet, um die Leistungsfähigkeit der entwickelten Systeme zu evaluieren. So wurde die Lektin-Zucker-Interaktion, zusammen mit dem im Arbeitskreis zuvor eingeführten Fusionsprotein ConA-Sav, verwendet.^[100] Dieses Fusionsprotein besteht aus zwei verschiedenen Bindedomänen. Die erste Bindedomäne besteht aus Concanavalin A (ConA), ein Lektin aus *Canavalia ensiformis*, welches als Lektin Polysaccharide Strukturen binden kann. Die zweite Bindedomäne ist Streptavidin (SA), ein Protein aus *Streptomyces avidinii*, welches eine hohe Affinität zu Biotin aufweist. Das generelle Setup der Oberfläche ist in Abb. 15 dargestellt.

Weitere Projekte wurden im Bereich der Biosensorik verfolgt, um einfache und schnelle Modifikationen von Oberflächen mit hohen immobilisierungsraten zu erreichen. Goldnanopartikel für die Immobilisierung von Biomolekülen auf der Sensoroberfläche waren die zweite Entwicklungsstufe. Hierbei tat sich BSA, aufgrund seiner Goldnanopartikel-koordinierenden Eigenschaften, als erste Modifikationsebene hervor.^[101,102] Nanopartikel zeigen eine gute Eigenschaft für die Biosensorik und sind ein Bereich wachsender Forschung, besonders im Bereich von pharmazeutischen und medizinischen Anwendungen. Ihre große Oberfläche und die geringen Anforderungen an Herstellung und Modifikation machen sie zu einem idealen Werkzeug zur Verstärkung des SPR-Signals.^[103] Eine weitere Eigenschaft, nämlich die nahezu frei einstellbaren Absorptionseigenschaften von Nanopartikeln, sollten genutzt werden, um eine weitere Verstärkung des Signals und somit der Empfindlichkeit des Sensorlayouts zu erreichen. Die hohe Affinität von bovinem Serumalbumin (BSA), welche auf rein elektrostatischer Natur beruht und somit weitere Modifikationen der Nanopartikel ermöglicht und eine Immobilisierung auf einer BSA-Oberfläche erlaubt, sollte für das Binden weiterer Biomoleküle genutzt werden (Abb. 16).^[101]

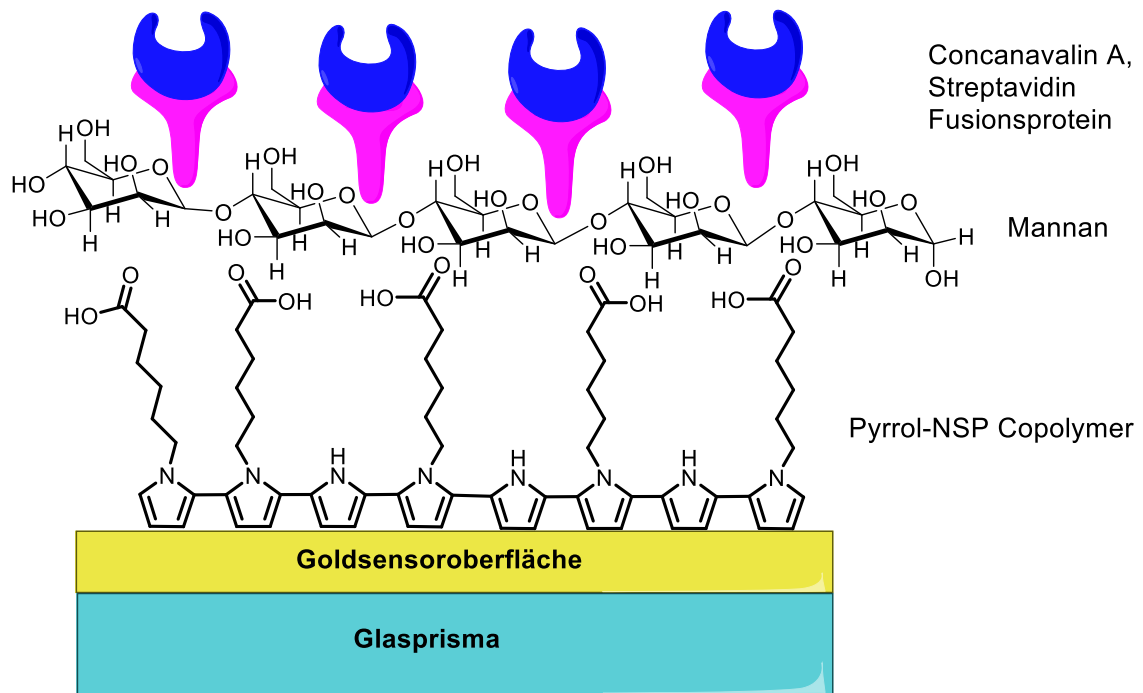


Abbildung 17: Generelle Oberflächenstruktur von Polypyrrol modifizierten SPR Chips für die Biosensorik

Weitere Proteine können potentiell für die Vermittlung zwischen Goldoberfläche und den Nanopartikeln genutzt werden, da lediglich zwei Parameter zu beachten sind: Zum einen die Größe des Proteins, zum anderen die Anzahl der oberflächenexponierten Lysine oder Cysteine, um die Goldoberfläche sowie die Nanopartikel koordinieren zu können.^[104] Da BSA jedoch die Anforderungen an Stabilität sowie kommerzielle Verfügbarkeit mehr als erfüllt, wurde dieses Protein ausgesucht.^[105]

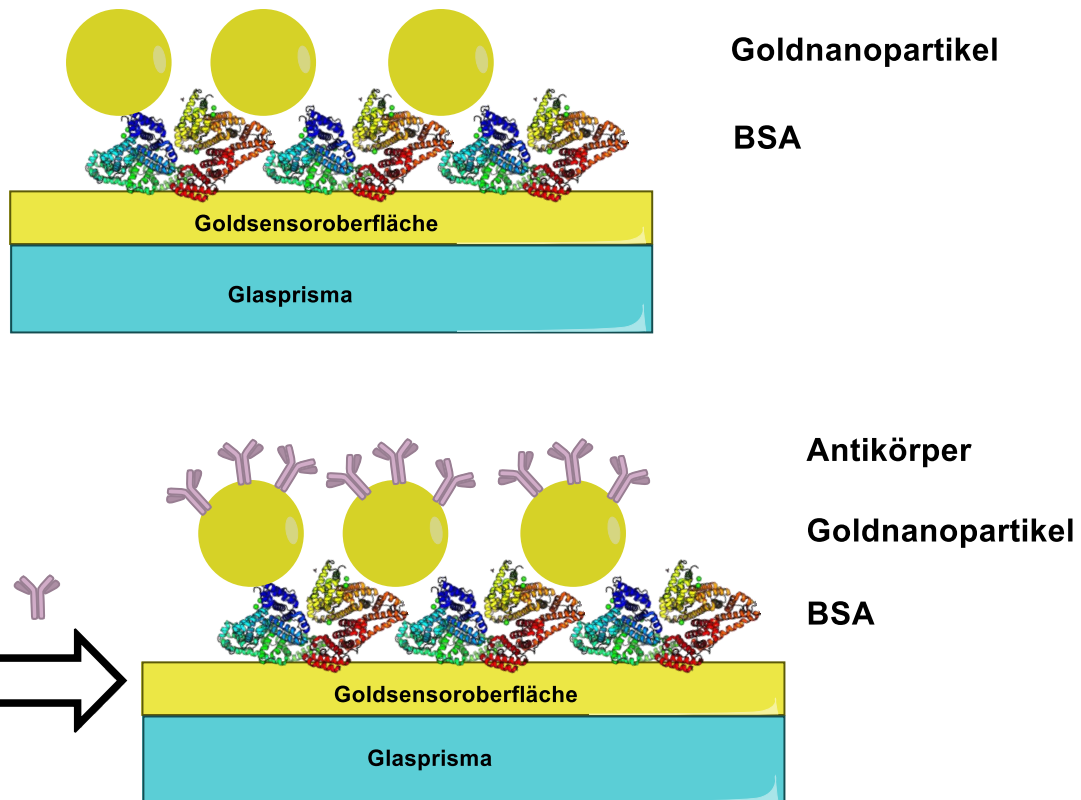


Abbildung 18: Schematische Darstellung der“ Sandwich“ SPR-Plattform.

BSA-basierte Systeme für die SPR sind im Bereich der Analytik von Pestiziden oder Drogen von besonderem Interesse.^[106,107] So konnten Sakai *et al.* zeigen, dass sich mittels BSA ein hochsensibler Nachweis auf Methamphetamin realisieren lässt.^[106]

1.12 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Forschungsarbeit war es, genauere Strukturinformationen zu Schwefelverbindungen in *Allium*-Arten zu erhalten, insbesondere zu dem roten Farbstoff aus der Untergattung *Melanocrommyum*, seinem Prekursor bzw. seinen Prekursoren, seiner (Bio)-Synthese sowie analytische Verifikation der publizierten Strukturen und seiner Synthese.

Die bis dato als korrekt geltende Struktur von KucEROVÁ *et al*, welche durch NMR-Analyse des Eduktes sowie NMR-Simulation der „Endstruktur“ ermittelt wurde, sollte verifiziert oder falsifiziert werden. Somit galt es einen Weg zu finden, die Symmetrie der Struktur durch Funktionalisierung zu brechen oder die Substanz zu kristallisieren, um so durch Kristallographie die Struktur eindeutig zu bestimmen. Es sollte eine klare Aussage getroffen werden können, welche Struktur korrekt ist. Im Falle, dass es sich um eine bis dato noch nicht publizierte Struktur handeln sollte, war das Ziel der Arbeit diese Struktur aufzuklären. Um den Prekursor bzw. ein Nebenprodukt des roten Farbstoffes in reiner Form zu erhalten, musste eine Methode für die präparative HPLC-Aminophase-Trennung entwickelt werden bzw. eine Probenvorbereitung gefunden werden, welche erlauben, das hoch instabile Molekül zu isolieren. Von bedeutendem wissenschaftlichem Interesse war die Synthese der Verbindung, da davon ausgegangen werden kann, dass die Bildung dieses roten Farbstoffes einen evolutionsbiologischen Vorteil mit sich bringt. Potenziell antibakterielle, antivirale oder anthelminthische Wirkungen sind denkbar.

Zusätzlich zu dem eigentlichen Thema sollten verschiedene Methoden zur Oberflächenmodifikation entwickelt werden, die für biosensorische Anwendungen dienen konnten. Besonders durch die Polymersisationsneigung pyrrolhaltiger Verbindungen, die auch innerhalb der Gattung *Allium* vorkommen, wurde ihre potentielle Verwendbarkeit für die Biosensorik untersucht. Es ergaben sich daraus Pyrrolverbindungen, Polysaccharide und über Umwege Goldnanopartikel sowie BSA. Die Anforderungen an die Oberflächen waren eine gute Modifizierbarkeit, einfache Darstellung und die Oberflächen sollten möglichst regenerierbar sein.

2 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden für die Arbeit grundlegende Methoden und Ansätze zur Lösung von Problemen im Bereich der Synthese beschrieben. So werden unter anderem die *Allium*-Probenvorbereitung, die Probenextraktion, die enzymatische Umsetzung von *Allium*-Lyophilisat und die Verwendung der Proben in der HPLC beschrieben. Weiterer Teil des Kapitels sind die Zusammensetzungen von verschiedenen, in der Arbeit verwendeten Reagenzien, Lösungen und Puffern.

2.1 Pflanzenproben

Pflanzenproben von *Allium giganteum* (Tax-Nummer: 6744) wurden von Herrn Prof. Dr. Keusgen auf Expeditionen Tadschikistan wild gesammelt. Verschiedene andere Taxa von *A. jesdianum*, *Allium macleanii*, *Allium rosenorum* sowie andere *Allium*-Spezies der Untergattung *Melanocrommyum* wurden freundlicherweise von Dr. R. M. Fritsch vom IPK-Gatersleben zur Verfügung gestellt.

Proben von *Allium rosenorum* sind (Tax-Nummer: 3781) auf dem Beet des Arbeitskreises Keusgen im Botanischen Garten Marburg geerntet worden.

Tabelle 4: Taxa und Acc. Nummern der Pflanzenproben.

Spezies	Tax- Nummer
<i>Allium jesdianum</i> (spp. angustitepatum)	6523, 1082, 1022, 6508
<i>Allium rosenorum</i>	6110, 5137, 2266, 6298, 3781
<i>Allium macleanii</i>	2218, 5455, 6555
<i>Allium carolineanum</i>	6276
<i>Allium giganteum</i>	6446, 6744, 6744

2.2 Probenvorbereitung und Alliinasereaktion

2.2.1 Probenvorbereitung

Die zu extrahierenden sowie zu analysierenden Pflanzenteile, in dieser Arbeit nur Zwiebeln, wurden allesamt unter flüssigem Stickstoff im Mörser fein gepulvert und im Anschluss lyophilisiert.

Nach abgeschlossener Trocknung, was in der Regel 48 Stunden dauerte, wurde erneut staubfein gepulvert, während die so erhaltenen Proben luftdicht verschlossen und gekühlt bei -25°C aufbewahrt worden sind. Der Vorteil dieser Methodik besteht darin, dass das Lyophilisat sofort für die Extraktion verwendet werden kann. Des Weiteren zeigt sich wegen des besseren Zellaufschlusses eine deutlich gesteigerte Rotfärbung bei der Umsetzung der Proben mit Allinase.

Trotz des unbemerkten Ausfalls eines Gefrierschranks, der sich während der Arbeit für mehrere Tage ereignete, konnten die darin gelagerten lyophilisierten Proben weiterhin für die enzymatische Umsetzung genutzt werden. Die Proben zeigten, verglichen mit bei konstant -25°C gelagerten Proben der gleichen Spezies, keinen reduzierten Gehalt an rotem Farbstoff.

2.2.2 Alliinasereaktion

Es wurde hierzu feingepulvertes Lyophilisat (20,0 g) mit Phosphatpuffer (100 mL) versetzt und durch schwenken des Reaktionsgefäßes, nach kurzer Dauer, eine breiige Masse erzeugt. Zu diesem Ansatz ist Alliinaseextrakt (0,500 mL) aus *Allium sativum* zugegeben und erneut durch starkes Schwenken durchgemischt worden. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für zwei bis drei Stunden inkubiert. Nach Beendigung der Reaktionszeit wurde das Reaktionsgefäß samt Inhalt durch flüssigen Stickstoff auf unter -30 °C gebracht und sofort lyophilisiert.

Als alternative Methode wurde das Lyophilisat (20,0 g) nur mit demineralisiertem Wasser (100 mL) versetzt. Der pH-Wert des Reaktionsansatzes betrug in diesen Fällen ca. 5,5 – 6,2, je nach eingesetzter Charge Lyophilisat. Es zeigte sich, dass Alliinasereaktionsansätze ohne die Verwendung von Phosphatpuffer und Zugabe von Alliinaseextrakt durch

Verlängerung der Reaktionsdauer auf drei bis vier Stunden keine Einbußen bei der Ausbeute der Schwefelverbindungen zeigten. Jedoch lieferten Ansätze ohne Phosphatpuffer besser aufzureinigende Extrakte, besonders beim Einsatz von Methanol als Lösungsmittel.

2.3 Probenextraktion

2.3.1 Herstellung methanolischer Extrakte für die Analyse von stark polaren Verbindungen

Die fein gepulverten Proben (20,0 g) wurden bei 40 °C mit jeweils vier mal 150 mL Methanol extrahiert (Abb. 19). Die Methanolextrakte wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Das erhaltene Produkt enthielt immer noch etwas Restfeuchte, die auch nach zwei Stunden bei ~30 mbar und 42°C nicht zu entfernen war. Der dabei gebildete leicht klebrige, tiefrote bis rot-orangene Schaum wurde entweder direkt weiterverwendet, oder bis zur Nutzung im Gefrierschrank bei -25°C aufbewahrt.



Abbildung 19: Extraktion des RF aus enzymatisch umgesetztem Allium Material.

2.3.1 Herstellung isopropanolischer Extrakte für die Analyse des roten Farbstoffes

Die Methodik verlief analog zur Herstellung methanolischer Extrakte, jedoch wurde als Solvens Isopropanol verwendet. Dies erlaubte, durch einen geringen Anteil extrahierter Fructane und anderer hochpolarer Verbindungen Matrixeffekte weitestgehend auszuschließen sowie die Lagerzeit der so erhaltenen Extrakte deutlich zu erhöhen.

2.4 Herstellung der verwendeten Puffer und Reagenzien

Chemikalien und Lösungsmittel

Alle Chemikalien sowie Lösungsmittel wurden in einer Reinheit von „reinst“ oder besser käuflich erworben. Die Lösungsmittel, die für die HPLC-Analytik verwendet wurden, waren „HPLC-grade“ Lösungsmittel.

Für die Säulenchromatographie wurden Lösungsmittel, falls diese aus der Chemikalienausgabe stammten, vor der Verwendung von höher siedenden Verunreinigungen durch Destillation befreit.

Tabelle 5: Substanzen und deren Hersteller.

Verbindung/ Substanz	Hersteller
NaCl, NaHCO ₃ , Na ₂ HPO ₄ , Na ₂ CO ₃ , KOH	ROTH
o-Phtaldialdehyd, Anilin, alle Glykane, Pd PEPPSI(ipr)	TCI
N-Methylpyrrol, Pd(Ac) ₂ , n-BuLi (1,9 M), Chloroform-D, S ₂ Cl ₂ , Indol, Dibenzothiophen, Thianthren, Bromessigsäure-tertbutylester, Iodacetamid, Glutathion (red.), t-BuLi (1,9 M),	Sigma Aldrich
Na ₂ SO ₄ , NaOH, Diethylether, MgSO ₄	Grüssing
S ₈	Riedel-de Haën
KMnO ₄ , 3-Cl-Anilin, Thiophen, Furan, Na ₂ B ₄ O ₇ *10 H ₂ O	Merck
Pyrrol, Thiophen	VWR
TOS-Cl, Boc ₂ O, NiDPPP, NaBH ₄ , 2 – und 3-Bromthiophen, Pyrrol,	Fluorochem
TMSBr	Acros

2.4.1 Boratpuffer pH 9,5

Es wurden 4,77 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ in 100 mL Wasser gelöst. Mit 5-molarer Natronlauge wurde ein pH-Wert von 9,5 eingestellt. Die so erhaltene Lösung ist mit zweifachem Nachspülen in einen 250-mL-Messkolben überführt und mit Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt worden.

2.4.2 Herstellung des OPA Derivatisierungsreagenzes

Zur Herstellung des Reagenzes wurden 140 mg *ortho*-Phthaldialdehyd unter Rühren in 5 mL Methanol gelöst. Nach vollständiger Lösung wurde langsam 200 μL 2-Methyl-2-propanthiol zugesetzt und 50 mL Boratpuffer (pH 9,5) langsam zugetropft. Das Reagenz lagerte vor der Verwendung unter Lichtausschluss für mindestens 12 Stunden bei Raumtemperatur. Die fertige Lösung ist circa drei Tage haltbar. Zur Verlängerung der Verwendbarkeit kann erneut 2-Methyl-2-propanthiol zugesetzt werden.

2.4.3 Herstellung einer 1-M Iodacetamidlösung

Es wurden 185,0 mg Iodacetamid in ein Eppendorfgefäß eingewogen, mit 1000 μL Methanol versetzt und durch kurzes Eintauchen in ein Ultraschallbad gelöst. Die fertige Lösung lagerte bei -25°C .

2.4.4 Herstellung des Phosphatpuffers pH 6,5

Für 1 L Phosphatpuffer pH 6,5 wurden 4,930 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat sowie 2,245 g Dinatriumhydrogenphosphat unter Rühren in 500 mL Wasser gelöst. Die Lösung ist mit einem Digital-pH-Meter getestet worden. Bei Abweichungen wurde mit 1 M Natronlauge oder H_3PO_4 der pH-Wert von 6,5 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung nach zweifachem Nachspülen in einen 1-L-Messkolben überführt und mit Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt.

2.4.5 HPLC-MS-Puffer

3,85 g Ammoniumacetat wurden in 800 mL Wasser gelöst. Der pH-Wert ist mit verdünnter Essigsäure auf pH 6,5 eingestellt worden. Die Lösung wurde in einen 1000-mL-Messkolben überführt und mit Wasser bis zur Eichmarke aufgefüllt.

2.4.5 SPR-Puffer und Reagenzien

Tabelle 6: Lösungen und Puffer für die Goldnanopartikel-Herstellung.

Reagenz / Puffer	Darstellung
Citrat - Puffer pH 3,4	133,0 mg Zitronensäure (2,8 mM) und 16,7 mg NaOH (1,8 mM) in 250 mL dest. H ₂ O.
Citrat - Puffer pH 6,4	133,0 mg Zitronensäure (2,8 mM) und 77,0 mg NaOH (7,7 mM) in 250 mL dest. H ₂ O.
Citrat - Puffer pH 3,4	16,0 mg Zitronensäure und 2,0 mg NaOH in 1 mL dest. H ₂ O
Citrat - Puffer pH 6,4	16,0 mg Zitronensäure und 10,0 mg NaOH in 1 mL dest. H ₂ O
<i>Aqua regia</i>	1:3 Mischung von HNO ₃ (65 %) und HCl (32 %)
HAuCl ₄ - Lösung (25 mM)	50,0 mg HAuCl ₄ trihydrat in 5 mL dest. H ₂ O.

Tabelle 7: Verschiedene Puffer und Lösungen für die SPR.

Reagenz / Puffer	Darstellung
PBS Puffer pH 7,4	8,00 g NaCl, 1,20 g KCl, 1,44 g NaH ₂ PO ₄ , 0,24 g KH ₂ PO ₄ , ad. 1,00 L H ₂ O. Einstellen: pH 7,4.
EDC/NHS Aktivierungsreagenz	1:1 Mischung: 0,4 M EDC HCl in H ₂ O. 0,1 M NHS in H ₂ O. (direkt vor der Verwendung gemischt)
Ethanolamin HCl	0,5 M Lösung in Wasser -> pH ~8
Mannan-Lösung	1,0 mg Mannan/1,00 mL H ₂ O
MA CM Polysaccharid-Lösung	2,0 mg/mL in 1,00 mL H ₂ O

2.5 Derivatisierung mittels OPA-Reagenz

Es wurden Methanolextrakt mit 4,95 mL OPA-Reagenz und 50 µL 2-Methyl-2-propanthiol versetzt und bis zur vollständigen Lösung geschwenkt oder mit Hilfe eines Ultraschallbades in Lösung gebracht. Bei dieser Reaktion war besonders darauf zu achten, dass unter dem Abzug gearbeitet und alle thiolhaltigen Lösungen und Reagenzien schnell verschlossen wurden, da zur Toxizität des 2-Methyl-2-propanthiols eine penetrante olfaktorische Belästigung kommt. Der Inhalt des Kolbens ist in 30 Min. in Dunkelheit zur Reaktion gebracht worden. Im Anschluss wurden 20 µL 1-M-IAA-Lösung zugesetzt. Nach einer fünfmündigen Inkubation ist die Reaktionslösung mit einem 0,45 µm-Spritzenfilter in eine 10-mL- „Falcon-Tube“ filtriert worden. Diese Lösungen wurden sogleich für analytische Messungen genutzt oder bei -25°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert. Der HPLC-Gradient wurde aus der Dissertation von Jan Kusterer (Universität Marburg, 2010) in leicht gekürzter Version übernommen (Tabelle 8).^[108]

2.7 Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden DC-Platten der Firma MACHEREY-NA-GEL des Typs SIL G-25 UV₂₅₄ verwendet. Die verwendeten Fließmittel waren bis auf PEE, welcher direkt von der Chemikalienausgabe des Fachbereiches Pharmazie der Universität Marburg bezogen worden war, von analytischer Reinheit (p.a.). Für saure Analysubstanzen wurde dem Fließmittel Essigsäure ~ 1 % zugesetzt, bei basischen Verbindungen Triethylamin ~1 %.

2.8 Ionenaustauschchromatographie

Um für die HPLC taugliche Extrakte zu erhalten, wurden Rohextrakte der Allium-Bulben mittels schwach und stark basischer Ionentauscher aufgereinigt (Dowex 01X2 sowie Dowex Marathon; V: 70 mL). Appliziert wurden die Proben cyclisch mittels einer Peristaltik-Pumpe. Die Dauer betrug je nach Fluss ca. eine Stunde (2 Säulenvolumen). Die Elution ist mittels 0.04 M HCl in dem jeweiligen Flussmittel (MeOH/H₂O 95:5) erreicht worden. Vor der eigentlichen präparativen HPLC wurde das Lösungsmittelvolumen stark eingengt und der Rückstand auf ca. MeOH/H₂O 95:5 rekonstituiert.

2.9 Präparative Säulenchromatographie (offene Säule)

Um die meisten Rohprodukte der durchgeführten Reaktionen zu purifizieren, wurde Säulenchromatographie verwendet. Es ist hierbei für einen Teil zu reinigendes Rohprodukt 50 Teile Silikagel verwendet worden (m/m). Das Silikagel wurde mittels des während der Trennung zu verwendenden Laufmittels aufgeschlämmt und je nach zu trennender Verbindung analog der Dünnschichtchromatographie Triethylamin oder Essigsäure zugegeben. Nach dem komprimieren der Säule ist das zu trennende Gemisch direkt auf die Säulenoberfläche aufgetragen oder im Falle von hochviskosen oder festen Verbindungen ein „Dryload“ appliziert worden. Die Fraktionen wurden den Säulenvolumen angepasst, und zu ca. 1/10 des Säulenvolumens fraktioniert. Die Benennung der einzelnen Fraktionen (1,2,3 ...) wurde nach der Reihenfolge der Elution von der Säule festgelegt (unpolar nach polar bei Normalphase Säulen)

2.10 HPLC-Gradienten und Methoden

2.10.1 Verwendete HPLC-Systeme:

1. Merck Hitachi L7400 Detektor, L7200 Autosampler, L7100 Pumpe mit L7000 Interface. Die Detektion erfolgte bei 338 nm für OPA-derivatisierte Cysteinsulfoxide. Die Säulentemperatur betrug 30°C, der verwendete Säulentyp war MACHEREY-NAGEL: EC 250/4 NUCLEODUR 100-5 C18ec. Die Flussrate lag bei 1,00 ml/Min.
2. Shimadzu LC 20 HPLC-System (Shimadzu, Kyoto, Japan) mit QTrap 2000, TurboIonSpray Ion Source (ESI-MS; Applied Biosystems/MDS Sciex, Toronto, Kanada). Die Säulentemperatur betrug 30°C, der verwendete Säulentyp war MACHEREY-NAGEL: EC 250/2 NUCLEODUR 100-5 C18ec. Die Flussrate lag bei 0,25 ml/Min.
3. Agilent 1100 Series (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) mit Autosampler und DAAD- Detektor. Die Säulentemperatur betrug 30°C, der verwendete Säulentyp war MACHEREY-NAGEL: NUCLEOSHELL 50-4,6 Phenyl-Hexyl, 2,7 µm. Die Flussrate lag bei 1,00 ml/Min.
4. Deltaprep 3000 (Waters Corporation, Milford, USA), präparative HPLC mit UV-VIS Detektor. Die Säulentemperatur betrug Raumtemperatur, der verwendete Säulentyp war: MZ 250/20 PerfectChrom 100 NH2.

2.10.2 Verwendete HPLC-Gradienten:

Tabelle 8: HPLC-Stufengradient für die Trennung von OPA-derivatisierten Proben.

Zeit [Min.]	Phosphatpuffer pH 6,5 [%]	Acetonitril [%]
0	78	22
20	78	22
49	75	25
50	75	25
54	71	29
55	71	29
63	68	32
65	63	37
75	63	37

Tabelle 9: Isokratischer HPLC-Gradient für die Trennung von underivatisierten natürlichen Pyrrol-Verbindungen auf Amino-Säulen.

Zeit [Min.]	Wasser [%]	Acetonitril [%]
0	20	80
35	20	80

2.11 Reinigung der SPR-Chips

Die mit Gold (50 nm) beschichteten SPR-Glasprismen wurden vor ihrer Verwendung mittels des nachfolgenden Protokolls gereinigt:

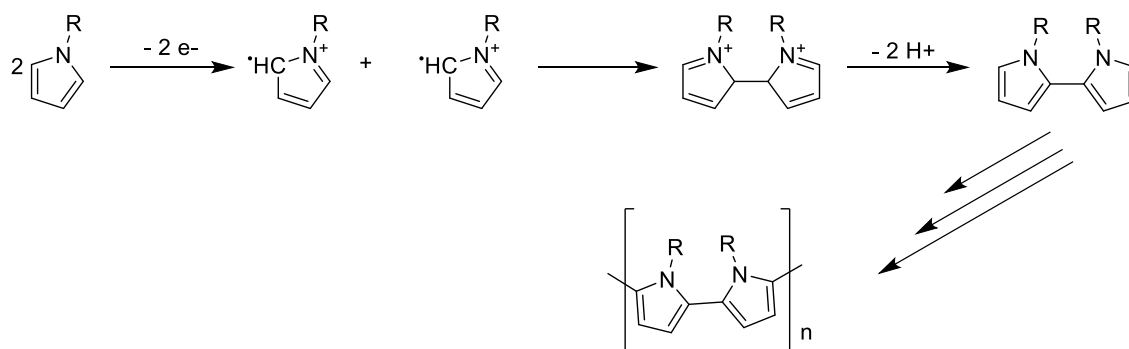
Um die Oberfläche gründlich zu entfetten, sind zuerst die Chips für fünf Min. mit Aceton gespült, dann mit Wasser gewaschen und nach Überführung in geeignete Glasgefäße mit 6 M NaOH für zwei Min. inkubiert worden. Die vorgereinigten Prismen wurden zur finalen Reinigung in einer Mischung 0.1M KOH und H₂O₂ (35 %) (Verhältnis 1:1) für 30 Min. bei 70-80°C inkubiert und dann gründlich mit H₂O gefolgt von Methanol gespült.

2.12 SPR Messungen

Nachdem die SPR-Chips mittels des beschriebenen Protokoll gereinigt bzw. voraktiviert wurden, fanden die eigentlichen Messungen statt, um das Bindungsverhalten verschiedenster Biomoleküle auf den entwickelten Oberflächen zu studieren. Hierbei erlaubte die SPR-Technik das label- und markerfreie Beobachten von Interaktionen in Echtzeit.^[12] Es wurde mittels eines 8-Kanal Küvetten basierten Geräts der Firma Plasmonic® Biosensor in Wallenfels Germany (Plasmonic SOne®) gemessen. Nachdem die Basislinie mit Puffer bzw. Wasser, je nach Lösungsmittel des zuerst zugegebenen Interaktionspartners, aufgenommen wurde, ist die Messung durch Zugabe der weiteren Verbindungen durchgeführt worden. Anzeige und Verarbeitung der Daten wurde von *Dr. Doru Vornicescu* mittels Origin Pro® 8.0 Software (Origin Lab, USA) durchgeführt.

2.13 Elektropolymerisation der Pyrrole auf SPR-Chips

Um die Goldoberfläche mittels Polypyrrol zu modifizieren, wurden Copolymere aus Pyrrol und N-substituierten Pyrrolen (NSP) durch Elektropolymerisation auf den Chips abgeschieden. Hierzu wurden die SPR Chips als Anode in einem Tauchbad des Pyrrols und NSP in Acetonitril sowie dem Leitsalz Tetrabutylammoniumtetrafluoroborat zu etwa zwei Dritteln eingetaucht und die Elektrode angeschlossen, wobei als Gegenelektrode ein weiteres recyceltes Goldprisma des gleichen Typs diente. Es ist für 10 Sekunden bei 0.8 V elektropolymerisiert worden, um das Polymer als kaum sichtbaren gräulich schwarzen Film auf der Goldoberfläche zu erhalten. Die Reaktion soll nach aktuellem Stand der Forschung nach dem von Diaz *et al.* publizierten Mechanismus ablaufen, bei dem an der Anode zuerst ein Pyrrol-Radikal-Kation gebildet wird, welches mit einem weiteren Radikal-Kation zu einem Dimer reagiert (Schema 15). Diese Reaktion läuft weitere Male ab, bis schließlich die Reaktion abgebrochen wird.^[109]



Schema 15: Elektropolymerisation von Pyrrolen nach Diaz *et al.*^[109]

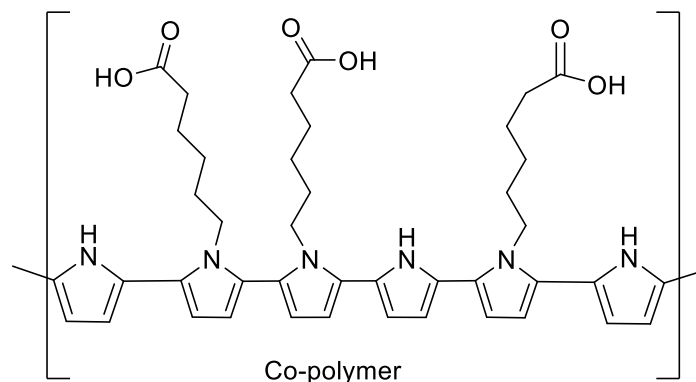
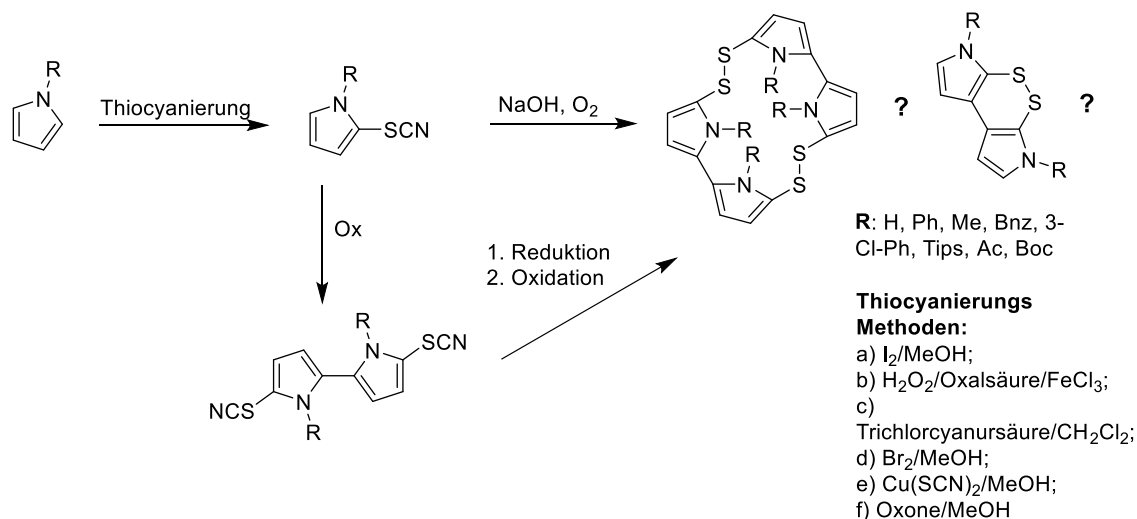


Abbildung 20: Schematische Darstellung des Copolymers aus Pyrrol und 6-(1H-Pyrrol-1-yl)hexansäure (PHCP).

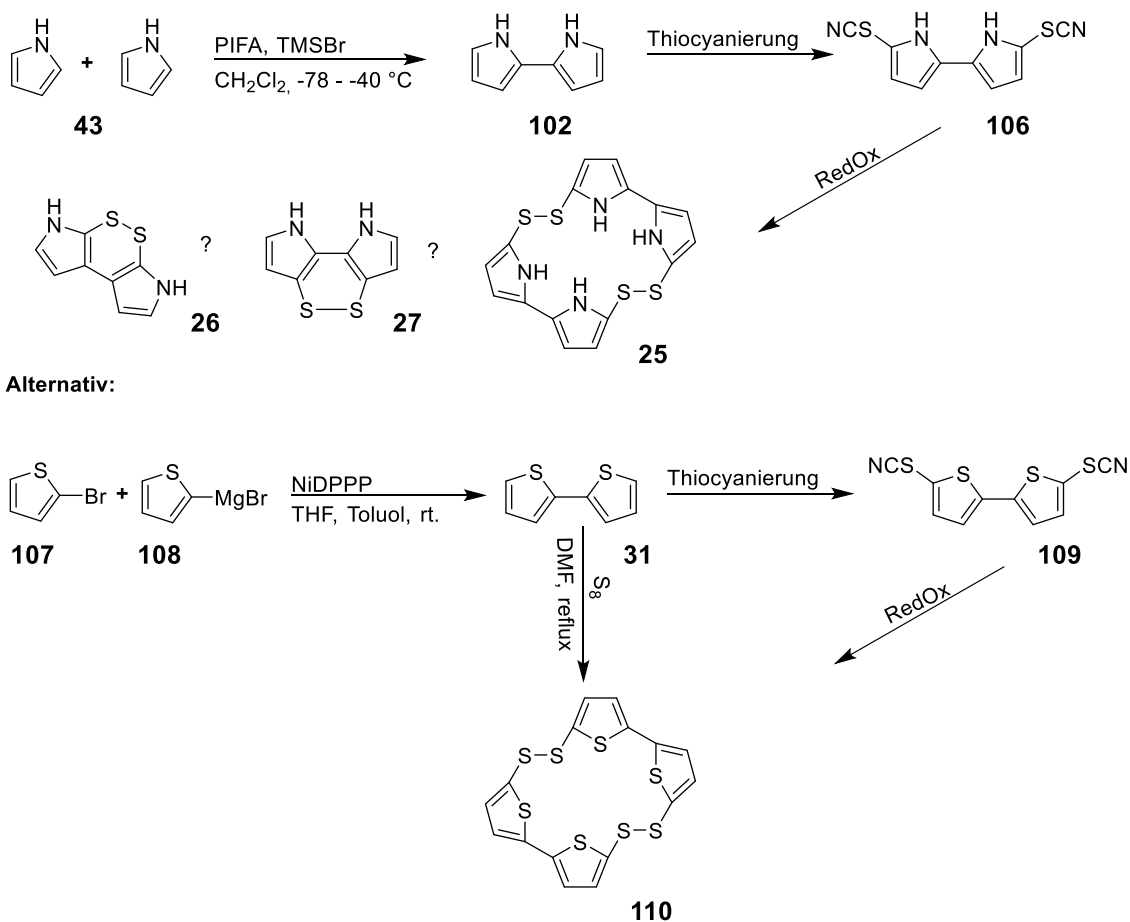
2.14 Synthesestrategien zur Darstellung des roten Farbstoffes

Um die Struktur des roten Farbstoffes endgültig zu klären, wurde die Synthese ausgehend von Thiocyanatopyrrolen als Sulfensäuresyntheton betrieben. Diese Verbindungen sind nicht nur relativ stabil, sondern auch einfach darzustellen. Da jedoch keine Möglichkeit bestand, die Ausgangsverbindungen käuflich zu erwerben (>300 €/g), wurden alle verwendeten organischen Thiocyanate selbst synthetisiert (Schema 16).



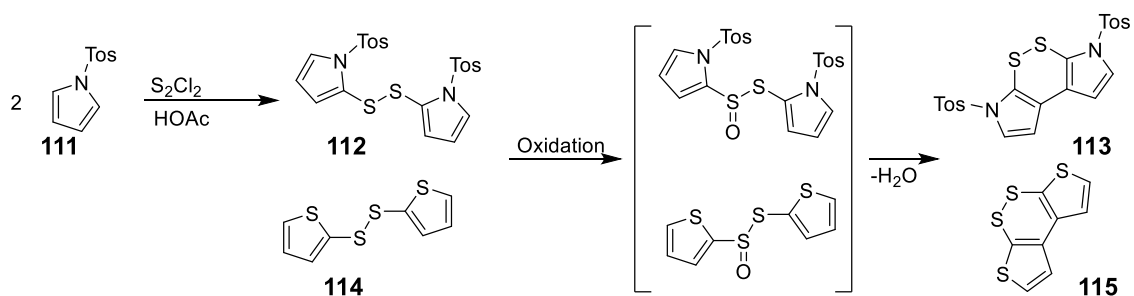
Schema 16: Theoretische Syntheserouten des roten Farbstoffes und seiner Analoga.

Diese Synthesestrategie via Thiocyanate sollte möglichst viele verschiedene Farbstoff-Analoga zugänglich machen, da im Vorfeld nicht bekannt war, wie stabil die einzelnen Substanzen sind. Bedenken herrschten vor allem im Bereich der Isolierung der Verbindungen sowie deren Analytik. Eine alternative Syntheseroute, ausgehend von Bipyrrolen, welche dann in einem zweiten Schritt thiocyaniert werden sollten (Schema 17), wurde angedacht. Auch die Herstellung von Thiophenanaloga, wobei als Edukte, Bithiophene eingesetzt werden sollten, wurde angestrebt. Dies war ein Versuch S-Analoga darzustellen, falls sich zeigte, dass der rote Farbstoff sich unter den Bedingungen eines normalen Syntheselabors nicht darstellen lassen sollte.



Schema 17: Alternative Synthese des roten Farbstoffes und seiner Analoga.

Zusätzlich zu den oben dargestellten Methoden wurde versucht, ausgehend von Disulfiden, eine durch Oxidationsmittels vermittelte Kondensation zu erreichen (Schema 18).



Schema 18: Syntheseroute von Dithiinen via disulfidischen Edukten.

Der Verlauf dieser Reaktionen führt vermutlich über Sulfinsäurethioester, die nach Allinasereaktion auch in *Allium*-Spezies zu finden sind.

3 Experimentaltteil

In diesem Kapitel werden die verschiedenen Syntheserouten der wichtigsten, während der Promotionsarbeit dargestellten Verbindungen, und deren analytischen Daten behandelt. Misslungene Experimente, deren Ergebnisse nicht weiter verwendet werden konnten sind nicht aufgeführt.

3.1 Synthese von Pyrrolverbindungen

Synthese von N-Tosylpyrrol (**111**)

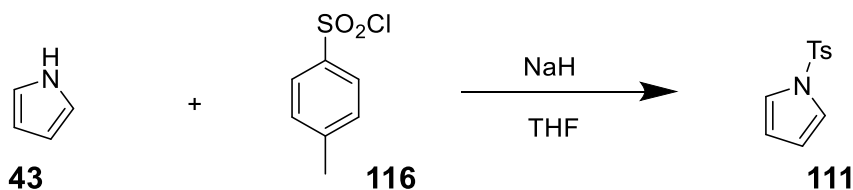


Tabelle 10: Ansatz Synthese N-Tosylpyrrol.

Stoff	M [g/mol]	n	M	ρ [g/cm ³]	V	eq
Pyrrol	67,09	58,0 mmol	3,891 g	0,97	4011 μ L	1
Tosylchlorid	190,64	58,0 mmol	11,057 g	-	-	1
THF	-	-	-	-	250,0 mL	-
NaH 70 %	23,99	69,6 mmol	2,385 g			1,2

Pyrrol (4011 μ L, 58,0 mmol, 1 eq) wurde unter Stickstoff als Schutzgas in THF (250 mL) gelöst und mittels eines Eisbads auf 0°C gekühlt. Unter starkem Rühren wurde binnen 10 Min. NaH (2,385 g, 69,6 mmol, 1,2 eq) portionsweise zugegeben und für weitere 10 Min. bei 0°C gerührt. Die Reaktionslösung wurde durch Entfernen des Kühlbades langsam auf R.T. gebracht und 1 Std. bei R.T. gerührt. Nun wurde langsam Tosylchlorid (11,057 g, 58,0 mmol, 1 eq) in 50,0 mL THF binnen 20 Min. zugetropft und für 12 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde langsam auf 500 mL Eis gegeben und dreimal mit 150 mL Et₂O extrahiert.

Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit Wasser gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 12,497 g eines braunen Feststoffes erhalten.

Das Rohprodukt wurde durch Umkristallisation aus Methanol Wasser 10:1 gereinigt.

Ausbeute: 9,803 g, 44,3 mmol, 76 %.

TLC: $R_f = 0,46$ (PEE/EE 10:1), 0,81 (PEE/EE 2:1).

^1H NMR (400 MHz): (CDCl_3): $\delta = 7,73$ (d, 2H, $J = 8,24$ Hz, CH), 7,27 (d, 2H, $J = 8,24$ Hz, CH), 6,40 (m, 2H, 3-H + 3'-H), 6,68 (m, 2H, 5-H + 5'-H) ppm.

MS (ESI): m/z ber. ($\text{M} + \text{Na}^+$): 244,04.

gef. 244,10.

Lit. Retich *et al.*^[110]

Synthese von N-Benzylpyrrol (**118**)

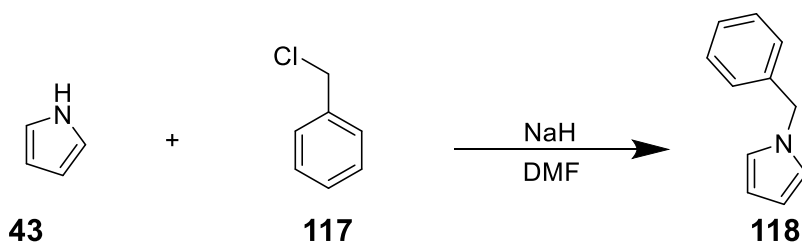


Tabelle 11: Ansatz Synthese von N-Benzylpyrrol.

Stoff	M [g/mol]	n	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
Pyrrol	67,09	29,8 mmol	2,000 g	0,97	2076 μL	1
Benzylchlorid	126,58	35,8 mmol	4,520 g	1,10	4116 μL	1,2
DMF	-	-	-	-	50,0 mL	-
NaH 70 %	23,99	44,7 mmol	1,073 g	-	-	1,5

Pyrrol (2076 μL , 29,8 mmol, 1 eq) wurde unter Stickstoff als Schutzgas in DMF (50 mL) gelöst. Unter starkem Rühren wurde, bei 0 °C, binnen 10 Min. NaH (1,073 g, 44,7 mmol, 1,5 eq) portionsweise zugegeben und für weitere 30 Min. gerührt. Nun wurde langsam Benzylchlorid (4116 μL , 35,8 mmol, 1,2 eq) in 50,0 mL THF binnen 20 Min. zugetropft für 1 Stunde bei 0° C zur Reaktion gebracht und nach Entfernen des Kühlbades für 12 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde langsam auf 200 mL Eis gegeben und dreimal mit 50 mL Et_2O extrahiert.

Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 4,532 g einer leicht braunen Flüssigkeit erhalten.

Das Rohprodukt wurde durch säulenchromatographische Trennung gereinigt (Silicalgel: 500 mL, d: 150 mm, Laufmittel: Cyclohexan, Flussrate: 50 mL/Min., Verwendete Fraktion: 1).

Ausbeute: 3,001 g, 19,1 mmol, 64 %, N-Bnz-pyrrol als farblose Flüssigkeit.

TLC: $R_f = 0,41$ (Cyclohexan)

^1H NMR (400 MHz): (CDCl_3): $\delta = 7,51\text{-}7,28$ (m, 3H, H_{arom}), 7,13 (d, $J = 7,33$ Hz, 2H, $2\times\text{C}_{\text{pha}}\text{H}$), 6,71 (t, $J = 2,06$ Hz, 2H, $2\times\text{C}_{\text{py}\alpha}\text{H}$), 6,21 (t, $J = 2,06$ Hz, 2H, $2\times\text{C}_{\text{py}\beta}\text{H}$), 5,09 (s, 2H, CH_2) ppm.

MS: m/z ber. ($\text{M}+\text{MeOH}+\text{H}^+$): 190,12.

gef. 190,30.

Lit. Taylor *et al.*^[111]

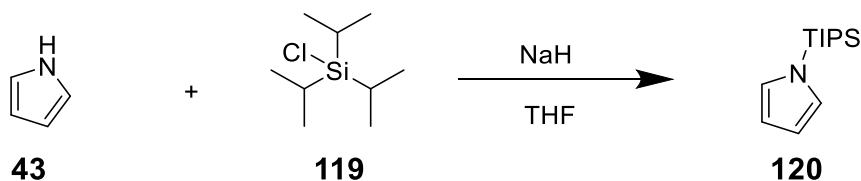
Synthese von N-Triisopropylsilylpyrrol (Tipspyrrol) (**120**)

Tabelle 12: Ansatz Synthese von N-Triisopropylsilylpyrrol

Stoff	M [g/mol]	n	M	ρ [g/cm ³]	V	eq
Pyrrol	67,09	40,0 mmol	2,684 g	0,97	2767 μ L	1
TIPS-chlorid	192,80	40,0 mmol	7,713 g	0,901	8560 μ L	1
THF	-	-	-	-	150,0 mL	-
NaH 70 %	23,99	54,0 mmol	1,850 g			1,35

Pyrrol (2767 μ L, 40,0 mmol, 1 eq) wurde in THF (150 mL) gelöst. Unter starkem Rühren wurde binnen 10 Min. NaH (1,850 g, 54,0 mmol, 1,35 eq) portionsweise zugegeben und für weitere 45 Min. gerührt. Nun wurde langsam TIPS-chlorid (8560 μ L, 40,0 mmol, 1 eq) binnen 15 Min. zugetropft und für 6 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 100 ml Cyclohexan versetzt und mittels einer Saugflasche und einer Glasfritte über eine kurze Silikagel-Säule (d:40 mm, $V_{\text{gesamt}} \sim 50$ mL) gereinigt und mit Cyclohexan nachgespült. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und erhaltene flüssige Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt (Silicalgel: 600 mL, d: 150 mm, Laufmittel: Cyclohexan, Flussrate: 50 mL/Min., Verwendete Fraktion: 1).

Ausbeute: 7,407 g, 33,1 mmol, 83 % Tipspyrrol, als wasserklare, leicht viskose Flüssigkeit.

Wurde die Reaktion unter Stickstoff als Schutzgas durchgeführt, konnte eine Ausbeute von 8,328 g, 37,3 mmol, 93 % erhalten werden.

TLC: $R_f = 0,51$ (Cyclohexan)

¹H NMR (400 MHz): (CDCl₃): $\delta = 6,82$ (t, $J = 1,87$ Hz, 2H, C $_{\alpha}$ H), 6,34 (t, $J = 1,87$ Hz, 2H, C $_{\beta}$ H), 1,47 (h, 3H, $J = 7,56$ Hz, CH(CH₃)₂), 1,12 (d, 18H, $J = 7,56$ Hz, CH₃) ppm.

Lit.: John *et al.*^[112]

Synthese von 2,3-Dimethylpyrrol (**123**)

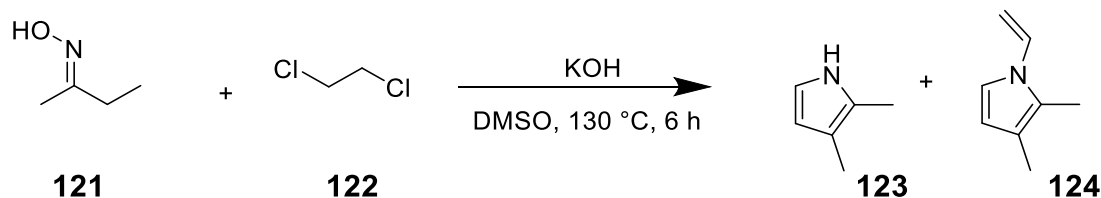


Tabelle 13: Ansatz Synthese von 2,3-Dimethylpyrrol.

Stoff	M [g/mol]	n	M	ρ [g/cm ³]	V	eq
Butan-2-oxim	87,12	0,300 mol	2,684 g	1,30	20,1 mL	1
DCE	95,95	0,900 mol	86,36 g	1,25	69,1 mL	3
DMSO	-	-	-	-	280 mL	-
KOH	56,11	2,400 mol	134,70 g			8

Das Oxim (20,1 mL, 0,300 mol, 1 eq) wurde in DMSO (200 mL) gelöst. Unter starkem Rühren wurde gemörserter KOH (134,7 g, 2,400 mol, 8 eq) portionsweise zugegeben und für weitere 10 Min. gerührt. Nun wurde langsam DCE (69,1 mL, 0,900 mol, 3 eq) in DMSO (80 mL) binnen 5 Stunden bei 130 °C zugetropft und nach beendeter Zugabe die Wärmequelle entfernt und für 8 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf Eis (400 mL) gegeben sowie mit Wasser (100 mL) versetzt. Nachdem das Gemisch Raumtemperatur erreicht hatte, wurde mit Chloroform (3x 300 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das schwarze Rohprodukt wurde destilliert (Destillationsanlage mit 15 cm Destillationskolonne und Claisen-Aufsatz sowie Spinnvorsatz für vier Fraktionen, Druck: 38 mbar, Temperatur: 70-100 °C) das Produkt wurde durch zusätzliche Säulenchromatographie gereinigt (Silicalgel: 600 mL d: 150 mm, Laufmittel: Petrolether/Diethylether 4:1, Flussrate: 40 mL/Min., Verwendete Fraktion: 2).

Ausbeute: 6,832 g, 71,8 mmol, 24 % 2,3-Dimethylpyrrol als gelb-orange Flüssigkeit.

Ausbeute: 1,032 g, 8,51 mmol, 3 % 2,3-Dimethyl-N-vinylpyrrol als gelbe Flüssigkeit.

TLC: Rf = 0,56; 0,28 (Cyclohexan/Ethylacetat; 30:1)

(2,3-Dimethyl-N-vinylpyrrol):

^1H NMR (400 MHz): (CDCl_3): δ = 6,88 (d, 1H, J = 3,23 Hz C_5H), 6,86 (dd, 1H, J = 8,01, 15,57 Hz, NCH), 6,03 (d, 1H, J = 3,23 Hz, C_4H), 5,05 (d, 1H, J = 15,57 Hz, CHH_e), 4,60 (d, 1H, J = 8,01 Hz, CHH_z), 2,17 (s, 3H, $\text{CH}_{3\alpha}$), 2,03 (s, 3H, $\text{CH}_{3\beta}$) ppm.

(2,3-Dimethylpyrrol):

^1H NMR (400 MHz): (CDCl_3): δ = 7,77 (s, 1H, NH), 6,85 (d, 1H, J = 2,52 Hz, C_5H), 6,00 (d, 1H, J = 2,52 Hz, C_4H), 2,18 (s, 3H, $\text{CH}_{3\alpha}$), 2,03 (s, 3H, $\text{CH}_{3\beta}$), ppm.

Lit. Torfimov *et al.*^[113]

3.2 Synthese von thiocyanierten und halogenierten Aromaten

2-Thiocyanato-tipspyrrol (**125**)

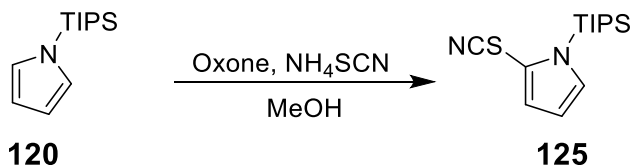


Tabelle 14: Ansatz Synthese von 2-Thiocyanato-tipspyrrol.

Stoff	M [g/mol]	n	M	ρ [g/cm ³]	V	eq
Tipspyrrrol	223,44	6,10 mmol	1,363 g	0,904	1508 μl	1
NH_4SCN	76,12	9,76 mmol	0,743 g			1,6
MeOH	-	-	-	-	60 mL	-
Oxone®	307,38	9,15 mmol	5,625 g			1,5

Tipspyrrrol (1508 μl , 1,363 g, 6.10 mmol, 1 eq) wurde in Methanol (60 mL) gelöst, es wurde NH_4SCN (0,743 g, 9.76 mmol 1.6 eq) zugegeben und bis zur kompletten Lösung beider Edukte gerührt. Zu dieser Lösung wurde Oxone® (5,625 g, 9.15 mmol, 1.5 eq) in mehreren Portionen binnen 10 Min. zugegeben. Nach 10 Min. weiterer Reaktion bei Raumtemperatur wurde 40 mL des Lösungsmittels unter reduziertem Druck entfernt und der dunkle Rückstand mit Wasser (150 mL) versetzt und mit CH_2Cl_2 (50 mL, 3x) extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit Wasser (50 mL, 3x) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet; das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt und das gelbliche Rohprodukt durch Säulenchromatographie (Silicalgel: 200 mL, d: 60 mm, Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat; 30/1, Flussrate: 20 mL/Min., verwendete Fraktion: 2) gereinigt (Eluent: Cyclohexan/Ethylacetat 30/1).

Ausbeute: TIPS-pyrrol (1.065 g, 3.78 mmol, 62 %) farblose viskose Flüssigkeit.

TLC: 0,38 (Cyclohexan/ Ethylacetat; 30/1)

NMR:

^1H : 400 MHz (CDCl_3): δ 7,02 – 6,94 (m, 1H); 6,79 – 6,74 (m, 1H); 6,47 – 6,44 (m, 1H); 1,42 (sep, 7.56 Hz, 3H); 1,09 (d, 7,56 Hz, 18H) ppm.

^{13}C : 101 MHz (CDCl_3): δ 124,3, 120,2, 111,9, 110,6, 103,3, 17,8, 12,4.

ESI MS: ber. für ($\text{M}+\text{H}^+$): 281,1488 ($\text{M}+\text{MeOH}+\text{H}^+$): 313,1780.

gef.: 281,1502 313,1764.

Lit: Bray *et al.*^[37]

Die für andere Pyrrolverbindungen bevorzugt verwendete I_2/MeOH Methode ließ sich für dieses Substrat nur stark eingeschränkt verwenden. Gründe hierfür waren die geringe Löslichkeit des Edukts in Methanol, sowie die geringe Reaktionsrate bei diesen Reaktionsbedingungen. Bereits nach wenigen Stunden Reaktionsdauer konnte das Auftreten des N-desilylierten Produktes beobachtet werden; nach ca. 10 Stunden Reaktionsdauer (DC: Verschwinden des Edukt-Spots) konnte kein 2-Thiocyanato-tipspyrrol im Rohprodukt mehr nachgewiesen werden; es konnte jedoch 2-Thiocyanatopyrrol in guter Ausbeute (>80 %) nach Säulenchromatographie (Silicalgel: 200 mL, d: 60 mm, Laufmittel: Cyclohexan/ Ethylacetat; 20/1, Flussrate: 20 mL/Min., verwendete Fraktion: 2) isoliert werden.

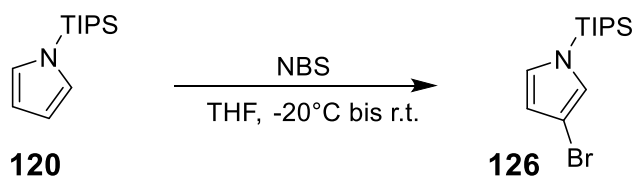
3-Brom-tipspyrrol (**126**)

Tabelle 15: Ansatz Synthese 3-Brom-TIPS-pyrrol.

Stoff	M [g/mol]	N	M	ρ [g/cm ³]	V	eq
Tipspyrrrol	223,44	10 mmol	2,234 g	0,904	2,472 mL	1
NBS	177,99	10 mmol	1,780 g			1
THF	-	-	-	-	60 mL	-

Tipspyrrrol (2472 μ L, 10 mmol, 1eq) wurde bei -20 °C in THF (60 mL) gelöst; es wurde NBS (1,780 g, 10 mmol 1 eq) in vier Portionen binnen 30 Min. zugegeben. Es wurde bei -20 °C für ca. eine Stunde gerührt. Nach Entfernen des Kühlbades wurde für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Zu dieser Lösung wurde Pyridin (~ 1 mL) zugegeben sowie Cyclohexan (60 mL); es wurde filtriert, die Mutterlauge am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit und das gelbliche Rohprodukt durch Säulenchromatographie gereinigt (Silicalgel: 300 mL, d: 60 mm, Laufmittel: Cyclohexan, Flussrate: ~15 mL/Min., verwendete Fraktion: 1).

Ausbeute: 2,877 g, 9,51 mmol, 95 % 3-Brom-TIPS-pyrrol als farblose hochviskose Flüssigkeit.

TLC: 0,44 (Cyclohexan)

NMR:

¹H: 400 MHz (CDCl₃): δ 6,73 – 6,70 (m, 1H); 6,66 (dd, $J = 2,75, 2,52$ Hz, 1H); 6,28 (dd, $J = 2,75, 1,37$ Hz, 1H); 1,42 (sep, 7,33 Hz, 3H); 1,09 (d, 7,33 Hz, 18H) ppm.

¹³C: (101 MHz CDCl₃): δ 126,9, 125,8, 123,8, 113,7, 18,2, 12,9 ppm.

Lit.: Korb *et al.*^[114]

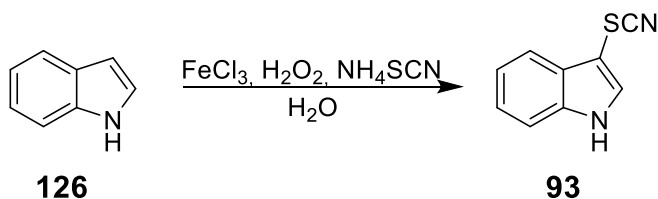
3-Thiocyanatoindol (**93**)

Tabelle 16: Ansatz Synthese von 3-Thiocyanatoindol.

Stoff	M [g/mol]	n	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
Indol	117,15	8,54 mmol	1,000 g			1
NH ₄ SCN	76,12	28,90 mmol	2,200 g			3,4
H ₂ O	-	-	-	-	35 mL	-
Oxals. Dihydrat	126,07	2,22	0,200 g			26 %
FeCl ₃ ·6 H ₂ O	270,29	0,15	0,040 g			2 %
H ₂ O ₂ (35 %)		27,78 mmol	2,736 g	1,14	2,40 mL	3,3

Es wurde Oxalsäurehydrat (200 mg, 2,22 mmol 26 mol %), FeCl₃ - Hexahydrat (40 mg, 0,15 mmol, 2mol %) sowie NH₄SCN (2,200 g, 28,90 mmol 3,4 eq) in Wasser (35 mL) unter starkem Rühren gelöst. Indol (1,000 g, 8,54 mmol, 1 eq) wurde in einer Portion in dieser Lösung suspendiert und H₂O₂ (35 %) (2,400 mL, 27,78 mmol, 3,3 eq) binnen 20 Min. zugetropft. Während der leicht exothermen Reaktion bildete sich eine Emulsion und der Inhalt des Kolbens nahm eine leicht bräunliche Farbe an. Nach Rühren des Reaktionsgemischs für vier Stunden bei Raumtemperatur wurde mit CH₂Cl₂ (60 mL, 3x) extrahiert, die organischen Phasen vereinigt und mit Wasser (10 mL, 2x) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und dann das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das gelbliche Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (Silicalgel: 130 mL, d: 60 mm, Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat 15/1, Flussrate: ~10 mL/Min., verwendete Fraktion: 2).

Ausbeute: 1,325 g, 7,60 mmol, 89 % 3-Thiocyanatoindol als leicht gelblicher Feststoff.

Durch Rückgewinnung von nicht abreagiertem Indol (Fraktion 1 der Säulenchromatographischen Trennung) kann die Ausbeute der Reaktion rechnerisch auf 95 % gesteigert werden (bezogen auf den Anteil des Indols, das reagiert hatte).

Diese Reaktion wurde hinsichtlich des Lösungsmittelvolumens sowie den Äquivalenten des Oxidationsmittels und der Reaktionsdauer optimiert und liefert gute Ausbeuten bei geringem Aufwand. Ein Nachteil der Reaktion ist jedoch, dass die empfindlicheren Pyrrole mittels dieser Methodik nicht thiocyaniert werden sollten, da die Ausbeuten bei unter 50 % liegen und sich schwer mittels Säulenchromatographie abzutrennende, dunkel gefärbte Verunreinigungen bilden.

TLC: 0,38 (Cyclohexan/ Ethylacetat, 10/1)

NMR:

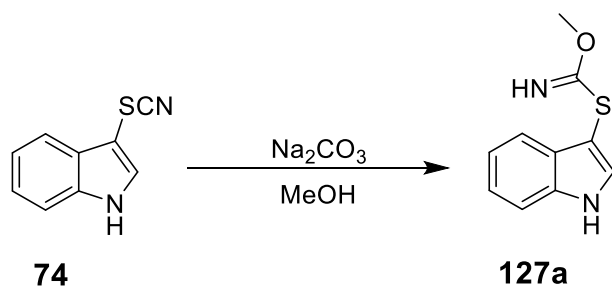
^1H : 400 MHz (CDCl_3): 8,75 (bs, 1H); δ 7,80 – 7,78 (m, 1H); 7,46 (d, $J = 2,86$ Hz, 1H); 7,43 – 7,39 (m, 1H); 7,38 – 7,29 (m, 2H).

^{13}C : 101 MHz (CDCl_3): δ 136,1, 131,2, 127,8, 124,0, 122,0, 118,8, 112,3, 92,1.

MS(ESI): m/z ber. für ($\text{M}+\text{H}^+$): 175,03

gef.: 175,11

Lit.: Yadav *et al.*^[43]

Indol-3-*O*-methyl-carbonimidothioat (**127**)Tabelle 17: Ansatz Synthese von Indol-3-*O*-methyl-carbonimidothioat.

Stoff	M [g/mol]	N	M	ρ [g/cm ³]	V	eq
3-SCN-indol	174,22	6 mmol	1,045 g			1
Na ₂ CO ₃	105,99	12 mmol	1,272 g			2
MeOH	-	-	-	-	80 mL	--

Zu einer Lösung von 3-Thiocyanatoindol (1,045 g, 6,00 mmol, 1 eq) in Methanol (80 mL) wurde Na₂CO₃ (1,272 g, 12, 00 mmol, 2 eq) in einer Portion zugegeben. Die Reaktion wurde in Kontakt mit Luft für 10 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, unter reduziertem Druck wurde das Lösungsmittel vollständig entfernt, der gelbe feste Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Silicalgel: 120 mL, d: 60 mm, Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat 4/1, Flussrate: ~10 mL/Min., verwendete Fraktion: 3) gereinigt.

Ausbeute: 231 mg, 1,12 mmol, 19 % Indol-3-*O*-methyl-carbonimidothioat als leicht gelblicher Feststoff.

Das Hauptprodukt der Reaktion (50 %) war 3,3'-Indoldisulfid (**127b**) (Fraktion 1).

TLC: 0,13 (Cyclohexan/ Ethylacetat, 4/1)

NMR:

¹H: (400 MHz DMSO D₆): 11,84 (bs, 1H); δ 7,74 (d, $J = 2,75$ Hz, 1H); 7,48 (d, $J = 8,01$ Hz, 1H); 7,40 (d, $J = 8,01$ Hz, 1H); 7,21 (dd (pt), $J = 8,01, 7,10$ Hz, 1H); 7,11 (dd (pt), $J = 7,10, 7,79$ Hz, 1H); 7,04 (bs, 1H), 3,74 (s, 3H) ppm.

¹³C: 101 MHz (DMSO D₆): δ 167,4, 137,2, 134,5, 128,7, 123,0, 121,1, 118,4, 113,1, 96,8, 56,0 ppm.

MS(ESI): ber. m/z ($M+H^+$): 207,06; gef. 207,03.

Lit. Grant & Snyder *et al.*^[115]

Synthese von N-(3-Chlorphenyl)-2-thiocyanatopyrrol (**129**)

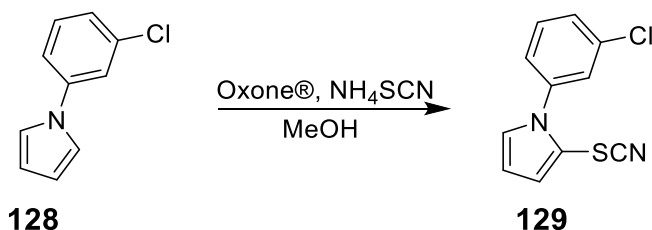


Tabelle 18: Ansatz Synthese von N-(3-Chlorphenyl)-2-thiocyanatopyrrol.

Stoff	M [g/mol]	N	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
N-3-ClPh-Pyrrol	177,63	14 mmol	2,487 g			1
NH ₄ SCN	76,12	30,8 mmol	2,344 g	-	-	2,2
MeOH	-	-	-	-	100,0 mL	--
Oxone®	357,02	28 mmol	9,996 g	-	-	2

N-3-ClPh-Pyrrol (2,487 g, 14,0 mmol, 1 eq) wurde zu einer Lösung von NH₄SCN (2,344 g, 30,8 mmol, 2,2 eq) in MeOH (100 mL) zugegeben. Unter starkem Rühren wurde Oxone® (9,996 g, 28,0 mmol, 2 eq) binnen 15 Min. in drei Portionen zugegeben und für drei Std. bei R.T. gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde filtriert, mit 200 ml Wasser versetzt und mit Dichlormethan (3x 70 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser (3x 50 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das gelbbraune Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (Silicalgel: 250 mL, d: 60 mm, Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat 30/1, Flussrate: ~20 mL/Min., verwendete Fraktion: 2).

Ausbeute: 2,271 g, 9,7 mmol, 69 % farblose hochviskose Flüssigkeit.

NMR:

¹H: (400 MHz CDCl₃): δ 7,46 (d, J = 5,27 Hz, 2H); 7,40 (s, 1H); 7,12-7,07 (m, 1H); 6,86-6,83 (m, 1H); 6,36 (t, J = 3,21 Hz, 1H) ppm.

^{13}C : (101 MHz CDCl_3): δ 139,4, 135,1, 130,5, 129,0, 127,0, 125,1, 123,3, 111,1, 110,6 ppm.

MS (ESI): ber. für $(\text{M}+\text{H}^+)$ 235,00, $(\text{M}+\text{MeOH}+\text{H}^+)$: 267,03

gef. 234,99 267,00

Lit. Kuhn *et al.*^[116]

Synthese von 2-Thiocyanatopyrrol (**69**)

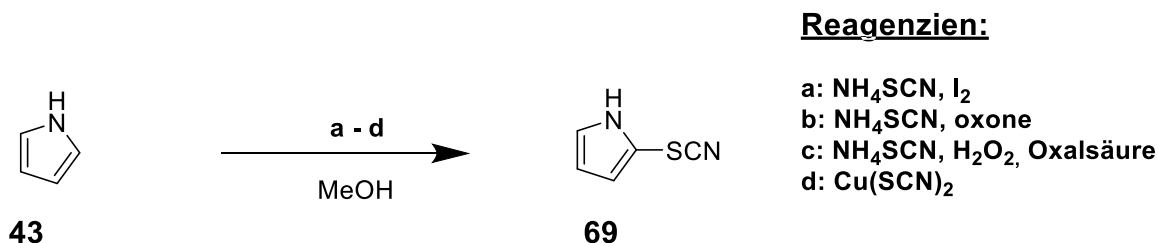


Tabelle 19: Ansatz Synthese von 2-Thiocyanatopyrrol a.

Stoff	M [g/mol]	N	M	ρ [g/cm ³]	V	eq
Pyrrol	67,09	50 mmol	3,355 g	0,97	3458 μL	1
NH_4SCN	76,12	150 mmol	11,418 g	-	-	3
MeOH	-	-	-	-	100,0 mL	--
Iod	253,82	25 mmol	6,346 g	-	-	0,5

a)

Pyrrol (3458 μL , 50,0 mmol, 1 eq) wurde in eine Lösung von NH_4SCN (11,418 g, 150,0 mmol, 3 eq) und Iod (6,346 g, 25,0 mmol, 0,5 eq) in MeOH (100 mL) binnen 10 Min. zugegeben und für 4 Std. bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 100 ml Wasser versetzt und mit Dichlormethan (3x 50 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde zuerst mit 10 % Natriumthiosulfat-Lösung gewaschen (2x 20 mL) und im Anschluss mit Wasser (2x 20 mL). Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Das leicht

braune Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (Silicalgel: 500 mL, d: 150 mm, Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat 8/1, Flussrate: ~40 mL/Min., verwendete Fraktion: 1).

Ausbeute: 4,912 g, 39,6 mmol, 79 %.

Tabelle 20: Ansatz Synthese von 2-Thiocyanatopyrrol **b**.

Stoff	M [g/mol]	N	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
Pyrrol	67,09	10 mmol	0,671 g	0,97	685 μ L	1
NH ₄ SCN	76,12	15 mmol	1,142 g	-	-	1,5
MeOH	-	-	-	-	100,0 mL	--
Oxone®	612,74	15 mmol	9,221 g	-	-	1,5

b)

Pyrrol (685 μ L, 10,0 mmol, 1 eq) wurde zu einer Lösung von NH₄SCN (1,142 g, 15,0 mmol, 1,5 eq) in MeOH (100 mL) zugegeben. Unter starkem Rühren wurde Oxone® (9,221 g, 15,0 mmol, 1,5 eq) binnen 15 Min. in drei Portionen zugegeben und für drei Std. bei R.T. gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 150 ml Wasser versetzt, von ungelösten Salzen abdekantiert und mit Dichlormethan (3x 50 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser (3x 20 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das gelbe Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (Silicalgel: 100 mL, d: 60 mm, Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat 8/1, Flussrate: ~10 mL/Min., verwendete Fraktion: 1).

Ausbeute: 1,035 g, 8,3 mmol, 83 %.

Tabelle 21: Ansatz Synthese von 2-Thiocyanatopyrrol **c**.

Stoff	M [g/mol]	n	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
Pyrrol	67,09	10,0 mmol	0,671 g	0,97	685 μ L	1,00
NH ₄ SCN	76,12	20,0 mmol	1,522 g	-	-	2,00
Wasser	-	-	-	-	30,0 mL	--
H ₂ O ₂ (35 %)	34,02	22,6 mmol		1,13	2,0 mL	2,25
Oxalsäure x2H ₂ O	126,07	0,2 mmol	0,025 g			0,02

c)

Pyrrol (685 μL , 10,0 mmol, 1 eq) wurde zu einer Lösung von NH_4SCN (1,522 g, 20,0 mmol, 2 eq) in Wasser (30 mL) zugegeben. Unter starkem Rühren wurde der Emulsion H_2O_2 (2,0 mL, 22,6 mmol, 2,25 eq) binnen 30 Min. zugetropft und für drei Std. bei R.T. gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Ethylacetat (3x 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde mit Wasser (2x 10 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das braun-schwarze Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Silicalgel: 100 mL, d: 60 mm, Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat 8/1, Flussrate: ~ 10 mL/Min., verwendete Fraktion: 1).

Ausbeute: 0,145 g, 1,2 mmol, 12 %.

Tabelle 22: Ansatz Synthese von 2-Thiocyanatopyrrol **d**.

Stoff	M [g/mol]	n	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
Pyrrol	67,09	10,0 mmol	0,671 g	0,97	685 μL	1,00
$\text{Cu}(\text{SCN})_2$	179,71	25,0 mmol	4,492 g	-	-	2,50
MeOH	-	-	-	-	80,0 mL	--

d)

Pyrrol (685 μL , 10,0 mmol, 1 eq) in Methanol (70 mL) gelöst. In vier Portionen wurde $\text{Cu}(\text{SCN})_2$ (4,492 g, 25,0 mmol, 2,50 eq) binnen 30 Min. zugegeben und für zwei Std. bei R.T. gerührt. Das nun grünliche Reaktionsgemisch wurde vom $\text{Cu}(\text{SCN})$ -Niederschlag durch Filtration befreit, der Rückstand mit Methanol kräftig nachgespült. Es wurde Wasser (200 mL) zugegeben und mit Dichlormethan (3x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde mit Wasser (2x 50 mL) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das grünliche Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie (Silicalgel: 100 mL, d: 60 mm, Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat 8/1, Flussrate: ~ 10 mL/Min., verwendete Fraktion: 1).

Ausbeute: 0,760 g, 6,1 mmol, 61 %.

TLC: 0.17 (Cyclohexan/Ethylacetat 10/1)

MS (ESI): ber. Für (M+H⁺): 125,0168

gef: 125,0170.

NMR:

¹H: 400 MHz (CDCl₃): δ 8,71 (bs, 1H), 7,04 - 6,94 (m, 1H), 6,68 – 6,60 (m, 1H), 6,31 – 6,22 (m, 1H) ppm.

¹³C: 101 MHz (CDCl₃): 124,5, 120,2, 111,4, 111,0, 103,1 ppm.

Analog zu diesen Syntheserouten wurde auch N-Methyl-2-thiocyanatopyrrol **71** hergestellt:

NMR:

¹H: 400 MHz (CDCl₃): δ 6,92 (dd, *J* = 2,29, 2,06 Hz, 1H), 6,62 (dd, *J* = 3,89, 1,83Hz, 1H), 6,31 – 6,22 (dd, *J* = 3,89, 1,83 Hz, 1H). 3,89 (s, 3H) ppm.

¹³C: 101 MHz (CDCl₃): 128,5, 120,9, 110,3, 109,7, 105,8, 34,7 ppm.

MS (ESI): ber. Für (M+H⁺) 139,03, (M+MeOH+H⁺) 171,06.

gef. 138,97 171,03.

Lit. Wu *et al.*^[44]

Yadav *et al.*^[43]

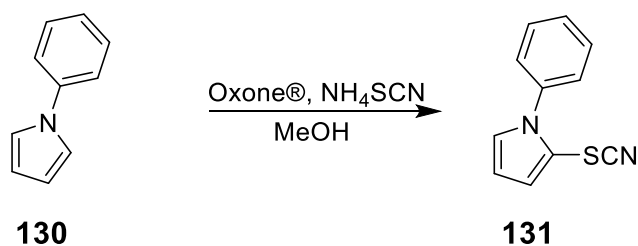
Synthese von N-Phenyl-2-thiocyanatopyrrol (**131**)

Tabelle 23: Ansatz Synthese von N-Phenyl-2-thiocyanatopyrrol.

Stoff	M [g/mol]	N	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
N-Ph-pyrrol	143,19	9,8 mmol	1,403 g			1
NH ₄ SCN	76,12	17,6 mmol	1,342 g	-	-	1,8
MeOH	-	-	-	-	70 mL	--
Oxone®	357,02	19,6 mmol	6,998 g	-	-	2

N-Ph-Pyrrol (1,403 g, 9,8 mmol, 1 eq) wurde zu einer Lösung von NH₄SCN (1,342 g, 17,6 mmol, 1,8 eq) in MeOH (70 mL) zugegeben. Unter starkem Rühren wurde Oxone® (6,998 g, 19,6 mmol, 2 eq) binnen 15 Min. in drei Portionen zugegeben und für drei Std. bei R.T. gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde filtriert, mit 200 ml Wasser versetzt und mit Dichlormethan (3x 70 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser (3x 50 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das gelbbraune Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (Silicalgel: 200 mL, d: 60 mm, Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat 30/1, Flussrate: ~20 mL/Min., verwendete Fraktion: 2).

Ausbeute: 1,209 g, 6,1 mmol, 62 % N-Phenyl-2-thiocyanatopyrrol als leicht gelblicher, wachsartiger Feststoff.

TLC: 0,32 (Cyclohexan/Ethylacetat; 30/1).

NMR:

¹H: (400 MHz CDCl₃): δ 7,55-7,45 (m, 3H); 7,41-7,38 (m, 2H); 7,12 (dd, $J = 2,98, 1,83$ Hz, 1H); 6,84 (dd, $J = 3,89, 1,83$ Hz, 1H); 6,36 (dd, $J = 3,89, 2,89$ Hz, 1H) ppm.

^{13}C : (101 MHz CDCl_3): δ 138,4, 129,5, 129,1, 128,7, 126,8, 122,7, 110,9, 110,7, 106,8 ppm.

MS (ESI): ber. Für $(\text{M}+\text{H}^+)$ 201,04, $(\text{M}+\text{MeOH}+\text{H}^+)$ 232,07.

gef. 202,10 232,03.

MP: 81 °C.

CHNS:

ber.: C: 65,98 %, H: 4,03 %, N: 13,99 %, S: 16,01.

gef.: C: 65,99, H: 4,12, N: 14,02, S: 16,12.

Analog zu dieser Methodik wurden auch 2-Thiocyanatothiophen sowie 2-Thiocyanatofuran dargestellt.

Lit. Fortes *et al.*^[117]

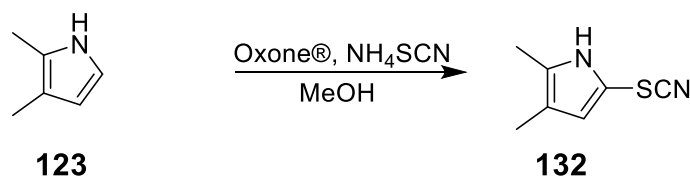
Synthese von 4,5-Dimethyl-2-thiocyanatopyrrol (**132**)

Tabelle 24: Ansatz Synthese von 4,5-Dimethyl-2-thiocyanatopyrrol.

Stoff	M [g/mol]	n	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
2,3-DiMepyrrol	95,15	10,0 mmol	1,403 g			1
NH ₄ SCN	76,12	18,0 mmol	1,370 g	-	-	1,8
MeOH	-	-	-	-	70 mL	--
Oxone®	357,02	18,0 mmol	6,426 g	-	-	1,8

3,4-Dimethylpyrrol (0,951 g, 10,0 mmol, 1 eq) wurde zu einer Lösung von NH₄SCN (1,370 g, 18,0 mmol, 1,8 eq) in MeOH (70 mL) zugegeben. Unter starkem Rühren wurde Oxone® (6,426 g, 18,0 mmol, 1,8 eq) binnen 15 Min. in drei Portionen zugegeben und für drei Std. bei R.T. gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde filtriert, mit 200 ml Wasser versetzt und mit Dichlormethan (3x 70 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser (3x 50 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das gelb-braune Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (Silicalgel: 200 mL, d: 60 mm, Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat 30/1, Flussrate: ~20 mL/Min., verwendete Fraktion: 2).

Ausbeute: 1,042 g, 6,8 mmol, 68 % braun rote Flüssigkeit.

TLC: 0,29 (Cyclohexan/Ethylacetat; 30/1).

NMR:

¹H: (400 MHz CDCl₃): δ 7,55-7,45 (m, 3H); 7,41-7,38 (m, 2H); 7,12 (dd, 2,98 1,83 Hz, 1H); 6,84 (dd, 3,89 1,83 Hz, 1H); 6,36 (dd, 3,89, 2,89 Hz, 1H) ppm.

¹³C: (101 MHz CDCl₃): δ 138,4, 129,5, 129,1, 128,7, 126,8, 122,7, 110,9, 110,7, 106,8 ppm.

MS (ESI):

ber. ($M+H^+$): 153,0476 ($M+MeOH+H^+$): 185,0743

gef. 153,0481 185,0749

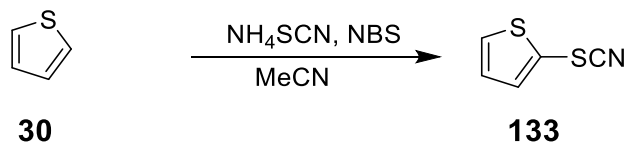
Synthese von 2-Thiocyanatothiophen (**133**)

Tabelle 25: Ansatz Synthese von 2-Thiocyanatothiophen.

Stoff	M [g/mol]	N	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
Thiophen	84,14	8,0 mmol	0,673 g	1,05	641 μ L	1
NH ₄ SCN	76,12	8,0 mmol	0,609 g	-	-	1
MeCN	-	-	-	-	50 mL	--
NBS	177,99	8,0 mmol	1,423 g	-	-	1
TiCl ₄					0,3 mL	

Thiophen (641 μ L, 8,0 mmol, 1 eq) wurde zu einer Suspension von NH₄SCN (0,609 g, 8,0 mmol, 1 eq) und NBS (1,423 g, 8,0 mmol, 1 eq) in MeCN (50 mL) gegeben, nach ca. 1 Minute wurde TiCl₄ (0,30 mL) zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde für 5 Std. bei R.T. gerührt und nach verschwinden des Edukts (DC) filtriert. Nach Zugabe von Cyclohexan (100 mL) wurde die organische Phase mit NaHCO₃ aq. (3x 30 mL) sowie H₂O (1x 20 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das gelbe Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (Silicalgel: 100 mL, d: 60 mm, Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat 30/1, Flussrate: ~10 mL/Min., verwendete Fraktion: 1).

Ausbeute: 0,483 g, 3,4 mmol, 43 % 2-Thiocyanatothiophen leicht gelbliche, stark riechende Flüssigkeit.

TLC: 0,39 (Cyclohexan/Ethylacetat: 7:1).

NMR:

^1H : (400 MHz CDCl_3): δ 7,59 (dd, $J = 4,12, 1,37$ Hz, 1H); 7,42 (dd, $J = 3,66, 1,37$ Hz, 1H); 7,08 (dd, $J = 3,66, 5,5$ Hz, 1H) ppm.

^{13}C : (101 MHz CDCl_3): δ 137,8, 133,9, 128,6, 118,4, 110,6 ppm.

MS (ESI):

ber. für ($\text{M} + \text{MeOH} + \text{H}^+$): 174,00 ($\text{M} + \text{Na}^+$): 163,96.

gef. 174,01 163,90.

Lit. Toste *et al.*^[118]

Synthese von 3,4-Dibromtipspyrrol (**134**)

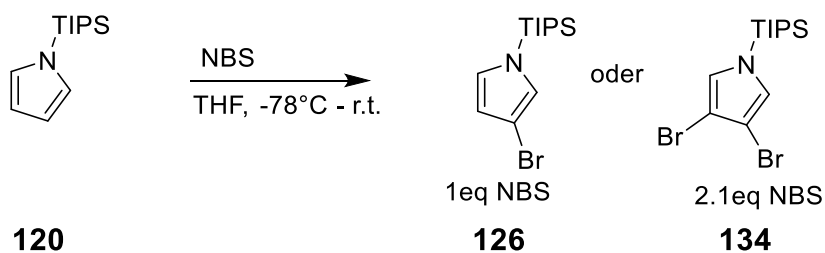


Tabelle 26: Ansatz Synthese von 3,4-Dibromtipspyrrol.

Stoff	M [g/mol]	N	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
Tipspyrrol	223,18	19,5 mmol	4,352 g	0,904	4820 μL	1,0
NBS (2,1 eq)	177,99	40,95 mmol	7,290 g	-	-	2,1
THF	-	-	-	-	70 mL	--
NBS (1 eq)	177,99	19,5 mmol	3,470 g			1,0

Tipspyrrol (4820 μL , 19,5 mmol, 1 eq) wurde unter Stickstoff als Schutzgas bei -78°C gelöst. Zu dieser Lösung wurde unter starkem Rühren in einer Portion NBS (7,290 g, 40,95 mmol, 2,1 eq) zugegeben und für 30 Min. bei -78°C gerührt. Die Reaktionsmi-

schung durch Entfernen des Kühlbades auf Raumtemperatur gebracht und für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer zu einem Großteil entfernt, mit Toluol (80 mL) versetzt und Succinimid abfiltriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde das Produkt mittels Säulenchromatographie gereinigt (Silicalgel: 600 mL, d: 150 mm, Laufmittel: Cyclohexan, Flussrate: ~40 mL/Min., verwendete Fraktion: 1).

Ausbeute: 3,4-Dibromtipspyrrol 6,521 g, 17,11 mmol, 87 %.

Ausbeute: 3-Bromtipspyrrol 5,421 g, 17,94 mmol, 92 % farblose viskose Flüssigkeit.

TLC: R_f : 0,56 (Cyclohexan) (Dibromotipspyrrol)

NMR: (DBrTP)

^1H : (400 MHz CDCl_3): δ 6,84 (s, 1H); 6,71 (s, 1H), 1,67 (h, $J = 7,56$ Hz, 3H), 1,13 (d, $J = 7,56$ Hz, 18H) ppm.

^{13}C : (101 MHz CDCl_3): δ 126,9, 125,8, 123,8, 113,7, 18,2, 12,9 ppm.

Literatur: Korb *et al.*^[114]

3.3 Synthese verschiedener Edukte und Oxidationsmittel

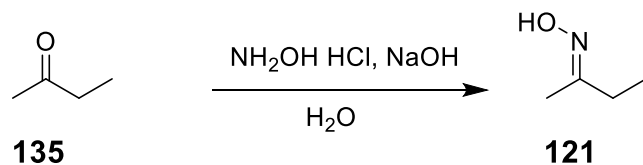
Synthese von Butan-2-oxim (**121**)

Tabelle 27: Ansatz Synthese von Butan-2-oxim.

Stoff	M [g/mol]	N	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
Methylethylketon	72,11	0,500 mol	36,01 g	0,805	44,8 mL	1
NH ₂ OH HCl	69,49	0,500 mol	34,74 g	-	-	1
H ₂ O	-	-	-	-	400, mL	--
NaOH		0,525 mol	30,00 g	-		1,05

NH₂OH HCl (34,74 g, 0,500 mol, 1 eq) wurde in H₂O (200 mL) gelöst zu dieser Lösung wurde NaOH (30,00 g, 0,525 mol, 1 eq) in H₂O (200 mL) binnen 10 Min. zugetropft und für 10 weitere Min. gerührt. MEK (44,8 mL, 0,500 mol, 1 eq) wurde mittels Tropftrichter rasch zugegeben und das Reaktionsgemisch für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Ablauf der Reaktionsdauer wurde die organische Phase abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer restliches MEK entfernt.

Ausbeute: 21,542 g, 0,247 mol, 49 % an e/z Butan 2-oxim als farblose, klare Flüssigkeit.

¹H NMR (400 MHz): (CDCl₃): δ = 9,75 (s, 1H, NOH), 2,37 + 2,19 (2x q, 0,66 + 1,33H, J = 7,59 Hz, e-z Isomere d. CH₂), 1,86 + 1,84 (2x s, 3H, e-z Isomere d. CNOHCH₃), 1,32 (q, 3H, J = 7,59 Hz, CH₂CH₃) ppm.

Lit.: Jain *et al.*^[119]

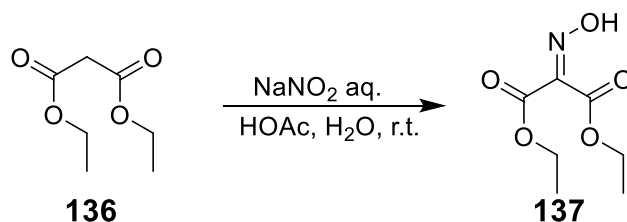
Synthese von 2-Hydroxyimino-diethylmalonat (**137**)

Tabelle 28: Ansatz Synthese von 2-Hydroxyimino-diethylmalonat.

Stoff	M [g/mol]	n	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
Diethylmalonat	160,17	0,6949 mol	111,3 g	1,05	106 mL	1,0
NaNO ₂	69,00	1,390 mol	95,90 g	-	-	2,0
HOAc	-	-	-	-	120 mL	--
H ₂ O	177,99	19,5 mmol	3,470 g		150 mL	1,0

Diethylmalonat (106 mL, 0,6949 mol, 1 eq) wurde bei Raumtemperatur in Eisessig (120 mL) gelöst. Es wurde unter starkem Rühren eine Lösung von Natriumnitrit (95,90 g, 1,390 mol, 2,0 eq) in Wasser (220 mL) binnen drei Stunden zugetropft und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit Diethylether (2x 200 mL) extrahiert, die organischen Phasen mit Wasser (2x 80 mL) sowie NaHCO₃ aq. (3x 50 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde das Produkt als tiefgelbe, ölige Flüssigkeit erhalten, welche durch fraktionierte Destillation (Apparatur siehe Dimethylpyrrol; p: ~30 mbar, Temperatur: 145 - 180 °C) aufgereinigt wurde. Der Siedepunkt der Hauptfraktion lag bei 145-165 °C.

Ausbeute: 2-Hydroxyimino-diethylmalonat 84,512 g, 446,76 mmol, 64 % tiefgelbe, ölige Flüssigkeit.

NMR:

¹H: (400 MHz CDCl₃): δ 10,40 (s, 1H, NOH); 4,35 (q, $J = 7,33$ Hz, 4H, OCH₂), 1,32 (t, $J = 7,33$ Hz, 6H, CH₃) ppm.

Lit.: Guo *et al.*^[120]

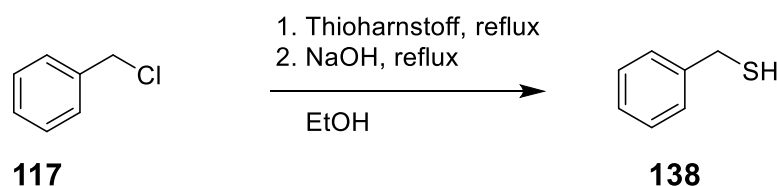
Synthese von Benzylmercaptan (**138**)

Tabelle 29: Ansatz Synthese von Benzylmercaptan.

Stoff	M [g/mol]	N	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
Benzylchlorid	126,58	39,6 mmol	5,012 g	1,10	4530 μ L	1
Thioharnstoff	76,12	52,6 mmol	4,003 g	-	-	1,3
EtOH	-	-	-	-	100,0 mL	--
NaOH 10M				-	30 mL	
HCl 4M					qs	

Benzylchlorid (4530 μ L, 39,6,0 mmol, 1 eq) wurde zusammen mit Thioharnstoff (4,003 g, 52,6 mmol, 1,3 eq) in EtOH (100 mL) für drei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde NaOH (10M, 30 mL) zugegeben und für weitere drei Stunden zum Sieden erhitzt und stark gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde, nachdem es auf Raumtemperatur abgekühlt war, mit HCl (4M, qs) auf einen pH-Wert von ~5 eingestellt und die Reaktionsmischung mit Ethylacetat (3x 80 mL) extrahiert; die organischen Phasen wurden mit wenig Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das gelbliche Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (Silicalgel: 500 mL, d: 150 mm, Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat 8/1, Flussrate: ~40 mL/Min., verwendete Fraktion: 1).

Ausbeute: 4,110 g, 33,1 mmol, 84 %.

¹H NMR (400 MHz): (CDCl₃): δ = 7,32 - 7,05 (m, 5H, H_{arom}), 3,67 (s, 2H, PhCH₂), 1,89 (s, 1H, SH) ppm.

Lit.: Kawatsura *et al.*^[121]

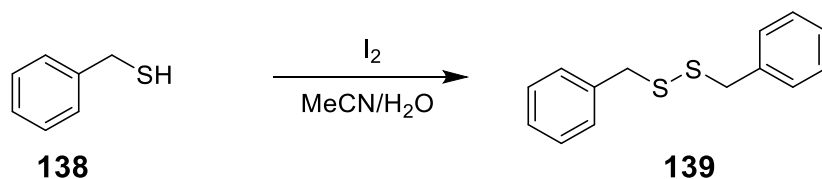
Synthese von Benzyldisulfid (**139**)

Tabelle 30: Ansatz Synthese von Benzyldisulfid.

Stoff	M [g/mol]	N	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
Benzylmercaptan	124,21	20,0 mmol	2,484 g	1,06	2340 μL	1,0
Iod	253,8	10,0 mmol	2,538 g	-	-	0,5
MeCN	-	-	-	-	60 mL	--
Wasser				-	10 mL	

Benzylmercaptan (2340 μL , 20,0 mmol, 1 eq) wurde zu einer Lösung von Iod (2,538 g, 10,0 mmol, 0,5 eq) in einem Gemisch aus MeCN (60 mL) und Wasser (10 mL) binnen 10 Min. zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt und dann 10 mL einer $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (10 % w/w) sowie 100 mL Wasser zugegeben. Das Produkt wurde mit Ethylacetat (3x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde das Produkt mittels Umkristallisation aus Methanol (99,9 %) gereinigt.

Ausbeute: Benzyldisulfid (2,042 g, 8,3 mmol, 83 %) als gelblicher Feststoff.

NMR:

^1H NMR (400 MHz): (CDCl_3): δ = 7,37 - 7,21 (m, 10H, H_{arom}), 3,61 (s, 4H, PhCH_2) ppm.

Lit.: Zeynizadeh *et al.*^[122]

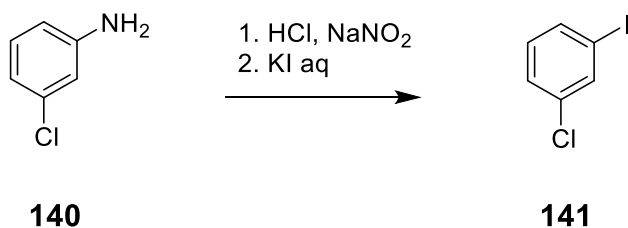
Synthese von 3-Chlor-1-iodbenzol (**141**)

Tabelle 31: Ansatz Synthese von 3-Chlor-1-iodbenzol.

Stoff	M [g/mol]	N	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
3-Cl-Anilin	127,57	71,0 mmol	9,057 g	1,21	7510 μ L	1,0
NaNO ₂	68,99	99,4 mmol	6,857 g	-	-	1,4
HCl 2,5M	-	-	-	-	130 mL	--
KI	166,00	85,2	14,143 g	-		1,2

3-Cl-Anilin (7510 μ L, 71,0 mmol, 1 eq) in HCl (2,5M, 130 mL) wurde auf 0 °C abgekühlt und stark gerührt. Es wurde zu dieser Lösung NaNO₂ (6,857 g, 99,4 mmol, 1,4 eq) in 30 mL Wasser binnen 45 Min. zugetropft. Die Temperatur wurde für 15 Min. bei 0°C gehalten und sodann KI (14,143g, 85,2 mmol, 1,2 eq) gelöst in 50 mL Wasser zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für eine halbe Stunde bei 0 °C und dann zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wurde mit Ethylacetat (3x 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde das Produkt mittels säulenchromatographischer Trennung gereinigt (Silicalgel: 800 mL, d: 200 mm, Laufmittel: Cyclohexan, Flussrate: ~40 mL/Min., verwendete Fraktion: 1).

TLC: 0,57 (Cyclohexan)

Ausbeute: 3-Chlor-1-iodbenzol (10,500 g, 44,0 mmol, 62 %) als farblose Flüssigkeit.

Das so erhaltene Produkt wurde direkt weiter umgesetzt zu: 3-Cl-PIFA

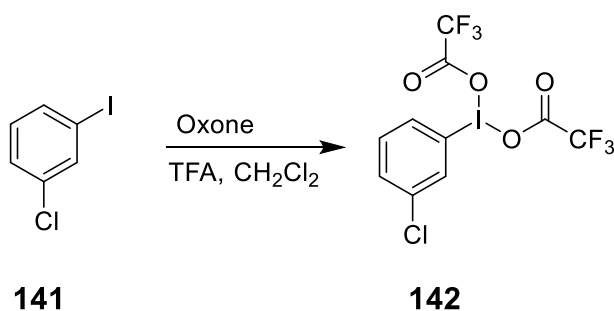
Synthese von 3-Chlor-PIFA (**142**)

Tabelle 32: Ansatz Synthese von 3-Chlor-PIFA.

Stoff	M [g/mol]	N	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
3-Cl-Iodbenzol	238,45	12,2 mmol	2,904 g	1,926	1508 μL	1,0
Oxone	307,38	24,4 mmol	7,500 g	-	-	2
TFA	-	-	-	-	40 mL	--
CH ₂ Cl ₂	-	-	-	-	15 mL	

3-Cl-1-Iodbenzol (1508 μL , 12,2 mmol, 1 eq) wurde in einer Mischung aus TFA (40 mL) und Dichlormethan (15 mL) gelöst. Zu dieser Lösung wurde unter starkem Rühren Oxone (7,500g, 24,4 mmol, 2eq) portionsweise binnen 15 Min. zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittelgemisch wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Dichlormethan (3x 80 mL) extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde das Produkt mittels Umkristallisation aus TFA/Cyclohexan 1:10 (V: 200 mL) gereinigt.

Ausbeute: 4,612 g, 9,9 mmol, 82 % 3-Chlor-PIFA als leicht gelblicher Feststoff.

NMR:

¹H: (400 MHz CDCl₃): δ 8,20 (t, $J = 1,83$ Hz, 1H); 8,15-8,07 (m, 1H); 7,71-7,67 (m, 1H), 7,57 (t, $J = 8,24$ Hz, 1H) ppm.

¹³C: (101 MHz CDCl₃): δ 161,2 (t, $J_{\text{CF}} = 41,2$ Hz), 137,4, 134,8, 134,2, 133,2, 132,7, 121,8, 112,9 (q, $J_{\text{CF}} = 289,0$ Hz) ppm.

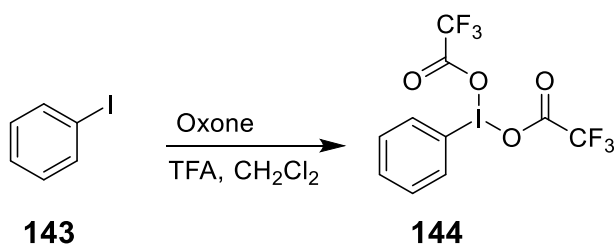
Synthese von PIFA (**144**)

Tabelle 33: Ansatz Synthese von PIFA.

Stoff	M [g/mol]	N	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
Iodbenzol	204,01	12,2 mmol	2,489 g	1,83	1360 μL	1,0
Oxone	307,38	24,4 mmol	7,500 g	-	-	2
TFA	-	-	-	-	40 mL	--
CH ₂ Cl ₂	-	-	-	-	15 mL	

Iodbenzol (1360 μL , 12,2 mmol, 1 eq) wurde in einer Mischung aus TFA (40 mL) und Dichlormethan (15 mL) gelöst. Zu dieser Lösung wurde unter starken Rühren Oxone (7,500g, 24,4 mmol, 2eq) portionsweise binnen 15 Min. zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittelgemisch wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand mittels Dichlormethans (3x 80 mL) extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde das Produkt mittels Umkristallisation aus TFA/Cyclohexan 1:10 (V: 200 mL) gereinigt.

Ausbeute: 2,781 g, 6,5 mmol, 53 % PIFA als leicht gelblicher Feststoff.

NMR:

¹H: (400 MHz CDCl₃): δ 8,21 (d, J = 7,56 Hz, 2H), 7,74 (t, J = 7,56 Hz, 1H), 7,61 (t, J = 7,56 Hz, 2H) ppm.

¹³C: (101 MHz CDCl₃): δ 161,2 (q, J_{CF} = 41,2 Hz), 135,3, 133,8, 132,2, 122,8, 112,9 (d, J_{CF} = 288,0 Hz) ppm.

Lit.: Zagulyaeva *et al.*^[123]

3.4 Synthese von Biarylverbindungen

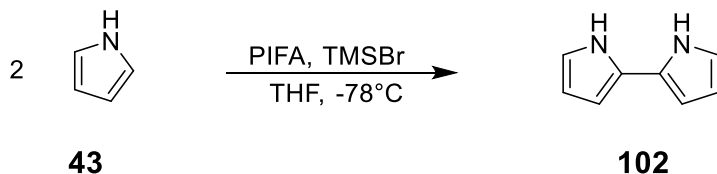
Synthese von 2,2'-Bipyrrol (**102**)

Tabelle 34: Ansatz Synthese von 2,2'-Bipyrrol.

Stoff	M [g/mol]	n	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
Pyrrol	67,09	6 mmol	0,403 g	0,975	413 μ L	1
TMSBr	153,09	3 mmol	0,459 g	1,16	396 μ L	0,5
THF	-	-	-	-	10,0 mL	--
PIFA	430,04	3 mmol	1,698 g	-	-	0,5

Pyrrol (413 μ L, 6 mmol, 1 eq) wurde in THF (10 mL) gelöst und unter Stickstoff als Schutzgas auf -78°C gekühlt. Unter starkem Rühren wurden TMSBr (396 μ L, 3 mmol, 0,5 eq) sowie PIFA (1,698 g, 3 mmol, 0,5 eq) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für weitere 60 Min. bei -78°C gerührt und im Anschluss durch Entfernen des Kühlbades langsam auf -10°C gebracht. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2M Natriumhydrogencarbonat-Lösung (20 mL) beendet und das Reaktionsgemisch mit Dichlormethan (3x 70 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit wenig Wasser (3x 10 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das braun-schwarze Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (Silicagel: 50 mL, d: 40 mm, Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat 5/1, Flussrate: ~5 mL/Min., verwendete Fraktion: 1).

Ausbeute: 182,0 mg, 1,4 mmol, 46 % Bipyrrol als farblose Kristalle.

Wurde die Reaktion mit BF₃-etherat in CH₂Cl₂ durchgeführt, so kam es zu einem höheren Grad an Polymerisation. Die Ausbeuten lagen bei ca. 40 %.

NMR:

^1H : (400 MHz MeOD): δ 6,64 (dd, $J = 2,75, 1,37$ Hz, 2H); 6,16 (dd, $J = 3,43, 1,37$ Hz 2H); 6,04 (dd, $J = 3,43, 2,75$ Hz, 2H) ppm.

^{13}C : (101 MHz MeOD): δ 126,5, 116,4, 107,9, 102,0 ppm.

MS (ESI):

ber. $[\text{M}+\text{H}^+]$: 132,07

gef. 133,08

Lit.: Dohi *et al.*^[61]

Synthese von 3,3'-Bitipsyrrrol (**145**)

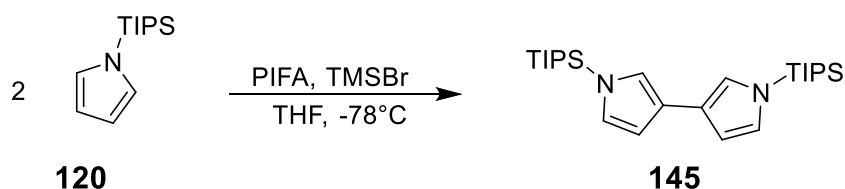


Tabelle 35: Ansatz Synthese von 3,3'-Bitipsyrrrol **a**.

Stoff	M [g/mol]	n	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
Tipspyrrrol	223,44	4 mmol	0,893 g	0,90	990 μL	1
TMSBr	153,09	2 mmol	0,306 g	1,16	264 μL	0,5
THF	-	-	-	-	10,0 mL	--
PIFA	430,04	2 mmol	0,860 g	-	-	0,5

a)

Tipspyrrrol (990 μL , 4 mmol, 1 eq) wurde in THF (10 mL) gelöst und unter Stickstoff als Schutzgas auf -78°C gekühlt. Unter starkem Rühren wurden TMSBr (264 μL , 2 mmol, 0,5 eq) sowie PIFA (0,860 g, 2 mmol, 0,5 eq) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für weitere 60 Min. bei -78°C gerührt und im Anschluss durch Entfernen des Kühlbades

langsam auf -15°C gebracht. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2M Natriumhydrogencarbonat-Lösung (20 mL) beendet und das Reaktionsgemisch mit Cyclohexan (3x 70 mL) extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser (3x 50 mL) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das dunkle Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (Silicalgel: 100 mL, d: 60 mm, Laufmittel: Cyclohexan, Flussrate: $\sim 10\text{ mL/Min.}$, verwendete Fraktion: 1).

Ausbeute: 647 mg, 1,45 mmol, 72 % Bitipspyrrol als farblose, hochviskose Flüssigkeit.

Des Weiteren wurden alternative Methoden der Darstellung untersucht; hierbei wurde 3-Bromtipspyrrol als Edukt verwendet.

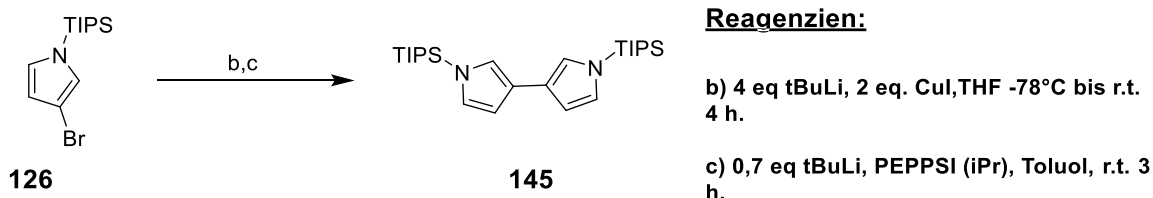


Tabelle 36: Ansatz Synthese von 3,3'-Bitipspyrrol **b**.

Stoff	M [g/mol]	N	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
3-Bromtipspyrrol	302,33	3,0 mmol	0,907 g	1,147	791 μL	1
t-BuLi 1,9M		2,1 mmol			1,11 mL	0,7
PEPPSi (iPr)	679,46	0,003 mmol	0,020 g	-		1 %
Toluol				-	12 mL	

b)

3-Bromtipspyrrol (791 μL , 3 mmol, 1 eq) wurde in Toluol (12 mL) unter Stickstoff als Schutzgas zusammen mit PEPPSI (20 mg, 0,003 mmol, 1 %) gelöst. Unter starkem Rühren wurde sodann t-BuLi (1,11 mL, 2,1 mmol, 0,7 eq) binnen einer Stunde zugegeben. Die sich langsam dunkelgelb färbende Reaktionsmischung wurde für weitere drei Stunden bei R.T. gerührt worden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Methanol (2 mL)

beendet, das Reaktionsgemisch vom Lösungsmittel befreit und das dunkelbraune Rohprodukt direkt mittels Säulenchromatographie gereinigt (Silicalgel: 100 mL, d: 60 mm, Laufmittel: Cyclohexan, Flussrate: ~10 mL/Min., verwendete Fraktion: 1).

Ausbeute: 457 mg, 1,03 mmol, 68 % farblose, hochviskose Flüssigkeit.

Tabelle 37: Ansatz Synthese von 3,3'-Bitipspyrrol c.

Stoff	M [g/mol]	n	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
3-Brom-tipspyrrol	302,33	3,0 mmol	0,907 g	1,147	791 μ L	1
t-BuLi 1,9M		12 mmol			6,31 mL	4
CuI	190,44	6 mmol	1,143 g	-		2
THF				-	15 mL	

c)

3-Bromtipspyrrol (791 μ L, 3 mmol, 1 eq) wurde in THF (15 mL) gelöst und unter Stickstoff als Schutzgas auf -78 °C abgekühlt und CuI (1,143 g, 6 mmol, 2 eq) in dieser Lösung suspendiert. Unter starkem Rühren ist t-BuLi (6,31 mL, 12 mmol, 4 eq) binnen einer Stunde zugegeben worden. Die Reaktionsmischung wurde für weitere 60 Min. bei -78°C gerührt und anschließend durch Entfernen des Kühlbades langsam auf R.T. gebracht. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 M CuSO₄-Lösung (20 mL) beendet, das Reaktionsgemisch mit Cyclohexan (3x 70 mL) extrahiert. Die organische Phase ist mit Wasser (3x 50 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet worden. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das dunkle Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (Silicalgel: 100 mL, d: 60 mm, Laufmittel: Cyclohexan, Flussrate: ~10 mL/Min., verwendete Fraktion: 1).

Ausbeute: 507 mg, 1,14 mmol, 90 % farblose, hochviskose Flüssigkeit.

TLC: R_f: 0,51 (Cyclohexan)

NMR:

¹H: (400 MHz CDCl₃): δ 6,72- 6,69 (m, 2H); 6,68-6,62 (m, 2H); 6,29-6,25 (m, 2H), 1,41 (h, J = 7,56 Hz, 6H), 1,10 (d, J = 7,56Hz, 36H) ppm.

^{13}C : (101 MHz CDCl_3): δ 124,8, 123,4, 113,1, 98,0, 17,8, 11,6 ppm.

IR (neat): 2922, 2853, 1462, 1378, 1214, 1079, 1008, 914, 884, 766, 693, 659, 580, 526 cm^{-1} .

Synthese von 2,2'-Bithiophen (**31**)

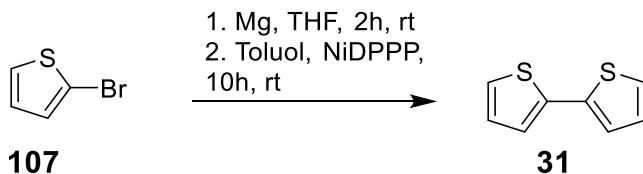


Tabelle 38: Ansatz Synthese 2,2'-Bithiophen.

Stoff	M [g/mol]	n	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
2-Bromthiophen	163,03	20 mmol	3,261 g	1,684	1940 μL	1,0
2-Bromthiophen	163,03	24 mmol	3,913 g	1,684	2320 μL	1,2
Magnesium	24,32	24 mmol	0,583 g	-	-	1,2
NiDPPP	542,04	1 mmol	0,542 g	-		0,05
THF	-	-	-	-	50 mL	
Toluol					120 mL	
NH_4Cl aq.					Qs.	

Bromthiophen (2320 μL , 24,0 mmol, 1,2 eq) wurde zu THF (50 mL) mit Magnesium (0,583 g, 24,0 mmol, 1,2 eq) binnen 30 Min. zugetropft und für weitere 90 Min. bei Raumtemperatur gerührt. Die Grignardverbindung in THF ist einer Toluol-Lösung (120 mL) von Bromthiophen (1940 μL , 20,0 mmol, 1,0 eq) und NiDPPP (0,542 g, 1 mmol, 0,05 eq) binnen einer Stunde zugetropft und die Reaktionsmischung unter Einwirkung von Luftsauerstoff für weitere 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt worden. Die Reaktion wurde nach Beendigung der 6 Stunden durch Zugabe von konzentrierter NH_4Cl -Lösung gequenched, die organische Phase abgetrennt und mit Wasser gewaschen (3x 50 mL). Nach Trocknen über Na_2SO_4 ist Toluol am Rotationsverdampfer entfernt und das dunkle Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt worden (Silicalgel: 400 mL, d: 150 mm, Laufmittel: Cyclohexan, Flussrate: ~ 40 mL/Min., verwendete Fraktion: 1).

Ausbeute: 2,261 g, 13,6 mmol, 68 % gelbe, langsam kristallisierende Flüssigkeit.

NMR:

^1H : (400 MHz CDCl_3): δ 7,21 (dd, 2H, $J = 5,04, 1,37$ Hz, C_5H); 7,18 (dd, 2H, $J = 3,66, 1,37$ Hz, C_3H), 7,02 (dd, 2H, $J = 5,04, 3,66$ Hz, C_4H) ppm.

Lit. Massoumi *et al.*^[124]

Synthese von 3,3'-Bithiophen (**147**)

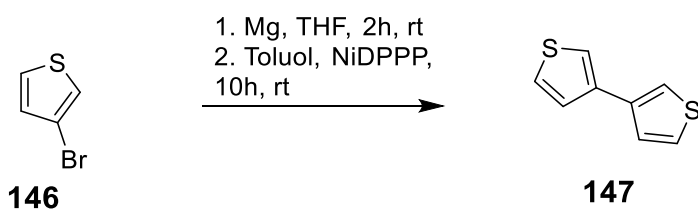


Tabelle 39: Ansatz Synthese 3,3'-Bithiophen.

Stoff	M [g/mol]	n	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
3-Bromthiophen	163,03	20 mmol	3,261 g	1,74	1874 μL	1,0
3-Bromthiophen	163,03	24 mmol	3,913 g	1,74	2250 μL	1,2
Magnesium	24,32	24 mmol	0,583 g	-	-	1,2
NiDPPP	542,04	1 mmol	0,542 g	-		0,05
THF	-	-	-	-	50 mL	
Toluol					120 mL	
NH_4Cl aq.					Qs.	

3-Bromthiophen (2250 μL , 24,0 mmol, 1,2 eq) wurde zu THF (50 mL) mit Magnesium (0,583 g, 24,0 mmol, 1,2 eq) binnen 30 Min. zugetropft und für weitere 90 Min. bei Raumtemperatur gerührt. Die Grignardverbindung in THF wurde einer Toluol-Lösung (120 mL) von Bromthiophen (1874 μL , 20,0 mmol, 1,0 eq) und NiDPPP (0,542 g, 1 mmol, 0,05 eq) binnen einer Stunde zugetropft und die Reaktionsmischung unter Einwirkung von Luftsauerstoff für weitere 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion ist nach Beendigung der 6 Stunden durch Zugabe von konzentrierter NH_4Cl -Lösung gequenched, die organische Phase abgetrennt und mit Wasser gewaschen worden

(3x 50 mL). Nach Trocknen über Na₂SO₄ wurde Toluol am Rotationsverdampfer entfernt und das dunkle Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt (Silicalgel: 400 mL, d: 150 mm, Laufmittel: Cyclohexan, Flussrate: ~40 mL/Min., verwendete Fraktion: 1).

Alternative Synthese via PEPPSI/ tBuLi bei r.t.

Ausbeute: 0,684 g, 5,1 mmol, 26 % 3,3'-Bithiophen farbloser, kristalliner Feststoff.
(23 % bei PEPPSI / tBuLi Methode)

TLC: R_f: 0,48 (Cyclohexan)

NMR:

¹H: (400 MHz CDCl₃): δ 7,41-7,20 (m, 6H) ppm.

¹³C: (101 MHz CDCl₃): δ 137,2, 126,3, 126,1, 119,7 ppm.

Lit.: Carpita *et al.*^[125]

Synthese von Biindol (**148**)

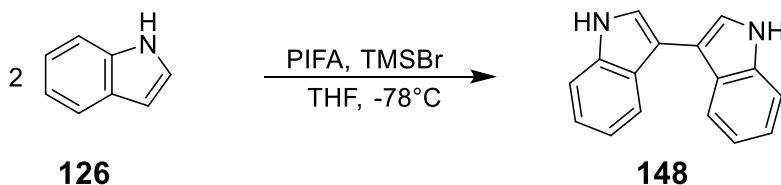


Tabelle 40: Ansatz Synthese von 3,3'-Biindol.

Stoff	M [g/mol]	n	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
Indol	117,15	20 mmol	2,343 g			1
TMSBr	153,09	10 mmol	1,530 g	1,16	1320 μL	0,5
THF	-	-	-	-	80,0 mL	--
PIFA	430,04	10 mmol	4,300 g	-	-	0,5

Indol (2,343 g, 20 mmol, 1 eq) wurde in THF (80 mL) gelöst und unter Stickstoff als Schutzgas auf -78°C gekühlt. Unter starkem Rühren wurden TMSBr (1320 μL, 10 mmol,

0,5 eq) sowie PIFA (4,300 g, 10 mmol, 0,5 eq) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für weitere 60 Min. bei -78°C gerührt und sodann durch Entfernen des Kühlbades langsam auf -20°C gebracht. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2M Natriumhydrogencarbonat-Lösung (100 mL) beendet. Das Reaktionsgemisch wurde mit Chloroform (3x 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (3x 50 mL) gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter reduziertem Druck entfernt. Das gelbe Rohprodukt ist mittels Säulenchromatographie gereinigt worden (Silicalgel: 250 mL, d: 150 mm, Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat 20/1, Flussrate: $\sim 20\text{ mL/Min.}$, verwendete Fraktion: 1).

Ausbeute: 695 mg, 2,97 mmol, 15 % Biindol als farbloser amorpher Feststoff.

TLC: R_f : 0,36 (Cyclohexan/Ethylacetat 20/1)

NMR:

^1H : (400 MHz CDCl_3): δ 11,23 (s, 2H), 7,81 (d, $J = 7,8\text{ Hz}$, 2H), 7,66 (d, $J = 2,4\text{ Hz}$, 2H), 7,47 (d, $J = 8,2\text{ Hz}$, 2H), 7,19-7,04 (m, 4H) ppm.

Lit: Li *et al.*^[126]

Synthese von 5,5'-Dibrom-2,2'-bithiophen (**149**)

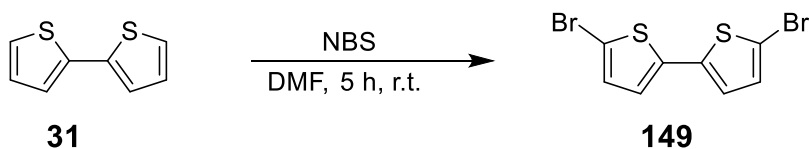


Tabelle 41: Ansatz Synthese 5,5'-Dibrom-2,2'-bithiophen.

Stoff	M [g/mol]	N	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
2,2'-Bithiophen	166,23	22 mmol	3,657 g			1,0
NBS	177,99	44,2 mmol	7,871 g			2,01
DMF				-	60 mL	

2,2'-Bithiophen (3,657 g, 22,0 mmol, 1 eq) wurde in DMF (60 mL) gelöst; die entstandene klare Lösung wurde auf ca. 0 °C gekühlt und NBS (7,871 g, 44,2 mmol, 2,01 eq) in vier Portionen binnen 30 Min. zugegeben. Die Reaktion wurde für 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, durch Zugabe von Natriumthiosulfat-Lösung (2M, 10 mL) wurde die Reaktion beendet und weitere 200 mL Wasser zugegeben. Es wurde mit Toluol (3x 80 mL) extrahiert, die organische Phase abgetrennt und mit Wasser gewaschen (3x 80 mL). Nach Trocknen über Na₂SO₄ wurde Toluol am Rotationsverdampfer entfernt und das gelbliche Rohprodukt durch Umkristallisieren aus Petrolether 60/80 (V: ~300 mL) gereinigt.

Ausbeute: 5,876 g, 18,2 mmol, 83 % leicht gelbliche Kristalle.

NMR:

¹H: (400 MHz CDCl₃): δ 6,95 (d, 2H, *J* = 3,89, C₄H); 6,84 (d, 2H, *J* = 3,89, C₃H) ppm.

¹³C: (101 MHz CDCl₃): δ 137,9 C₅Br, 130,8 C₂, 124,2 C₄H, 111,6 C₃H ppm.

Lit.: Reuter *et al.*^[127]

3.5 Synthese des roten Farbstoffs

Synthese des roten Farbstoffs (25)

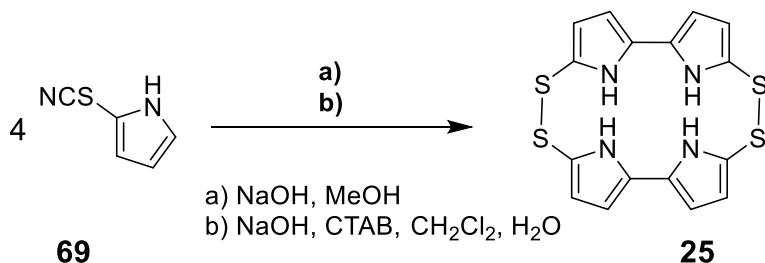


Tabelle 42: Ansatz Synthese des roten Farbstoffs.

Stoff	M [g/mol]	n	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
2-Thiocyanatopyrrol	124,16	2 mmol	248 mg	1,18	210 μ L	1,0
NaOH	39,99	2 mmol	38 mg			1
Methanol				-	30 mL	

a)

Zu einer stark gerührten 2-Thiocyanatpyrrol (210 μ L, 2 mmol, 1 eq) in Methanol (30 mL) wurde NaOH (80 mg, 2 mmol, 1eq) in einer Portion zugegeben. Die Reaktion ist für eine Stunde bei Raumtemperatur und in Kontakt mit Luft gerührt worden. Es wurde anschließend Silikagel (Typ: MN SG60, V: ~ 3 mL) zugegeben und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bis zur kompletten Trockenheit entfernt. Der dunkle "Dryload" ist durch Säulenchromatographie gereinigt worden (Silicalgel: 30 mL, d: 20 mm, Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat 30/1, Flussrate: ~3 mL/Min., verwendete Fraktion: 1).

Ausbeute: 10,1 mg, 25,7 μ mol, 5 % Roter Farbstoff als rot orangene, ölige Substanz.

b)

Zu einer stark gerührten 2-Thiocyanatpyrrol (210 μL , 2 mmol, 1eq) und CTAB (36,5 mg, 0,1 mmol, 5 %) in CH_2Cl_2 (30 mL) ist NaOH (38 mg, 1 mmol, 0,5 eq) in Wasser (1000 μL) in einer Portion zugegeben worden. Die Reaktion wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur und in Kontakt mit Luft gerührt und im Anschluss Silikagel (Typ: MN SG60, V: ~ 3 mL) zugegeben und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bis zur kompletten Trockenheit entfernt. Der dunkle "Dryload" ist durch Säulenchromatographie gereinigt worden (Silicalgel: 30 mL, d: 20 mm, Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat 30/1, Flussrate: ~ 3 mL/Min., verwendete Fraktion: 1).

Ausbeute: 17,6 mg, 45,3 μmol , 9 % Roter Farbstoff als rot orangene, ölige Substanz.

TLC: R_f : 0,32 (Cyclohexan/Ethylacetat 30/1)

HR ESI MS: ber. für $(M - H^+)$: 386,9872, $(M - 2H^+)^-$: 192,9899.

gef. 386,9872 192,9894.

NMR:

^1H : (400 MHz DMSO D_6): δ 12,36 (bs, 4H); 6,34 (d, $J = 2,52$ Hz, 4H); 6,23 (d, $J = 2,52$ Hz, 4H) ppm.

^{13}C : (101 MHz MeOD D_4): δ 132,0, 125,5, 120,3, 108,0 ppm.

UV/VIS: λ_{max} : 519,5 nm.

IR (neat): 3370, 2922, 2851, 2360, 2341, 1524, 1455. 1392, 1186, 1073, 1046, 1038, 768 cm^{-1} .

Tabelle 43: Übersicht der Ausbeuten des roten Farbstoffes bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen.

Lösungsmittel	Konzentration	Reagenz	eq.	Temp.	Ausbeute
MeOH	66 mM	NaOH	0.5	r.t.	1 %
MeOH	66 mM	NaOH	1	r.t.	5 %
CH ₂ Cl ₂ /H ₂ O	66 mM	NaOH	0.5	r.t.	9 %
MeOH/H ₂ O	66 mM	NaBH ₄	1	r.t.	0 %

3.6 Synthese von Schwefelverbindungen mittels elementarem Schwefel und Schwefelmonochlorid

Synthese von Biindolotetrasulfid (**150**)

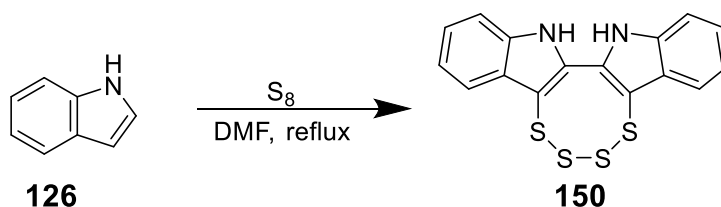


Tabelle 44: Ansatz Synthese von Biindolotetrasulfid.

Stoff	M [g/mol]	n	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
Indol	117,15	50 mmol	5,858 g			1
Schwefel	32,07	150 mmol	4,810 g			3
DMF	-	-	-	-	27 mL	--

Es wurden Indol (5,858 g, 50,00 mmol, 1 eq) und Schwefel (4,810 g, 150,00 mmol, 3 eq) in DMF (27 mL) suspendiert und die entstandene Suspension unter Stickstoff als Schutzgas für drei Stunden zum Sieden erhitzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei

Raumtemperatur inkubiert. Die erstandenen gelblich-grünen Kristalle wurden mittels Glasfritte scharf abgesaugt und mit CS₂ (4x40 mL) gewaschen. Die Mutterlauge wurde verworfen, das kristalline Produkt wurde unter Vakuum getrocknet.

Ausbeute: Biindolotetrasulfid (7,050 g, 12,0 mmol, 96 %) als gelb-grüner, kristalliner Feststoff mit geringer DMF-Verunreinigung. Die Verbindung wurde aus Aceton (~ 350 mL) umkristallisiert, um feine gelbe Kristalle zu erhalten die für die Elementaranalyse genutzt werden sollten.

TLC: R_f: 0,31 (Cyclohexan/Ethylacetat 4/1)

NMR:

¹H: (400 MHz DMSO D₆): 12,09 (4s, 1H, NH); δ 7,47-7,40 (m, 4H, C₃H); 7,30-7,20 (m, 8H, C₅H+C₆H) 7,05-6,95 (m, 4H, C₄H) ppm.

¹³C: 101 MHz (DMSO D₆): δ 136,7 (C₆*), 127,4 (C₂*), 125,4 (C₁), 125,0 (C₃), 120,8 (C₅H), 120,7 (C₄H), 119,8 (C₆H), 112,7 (C₂) ppm.

MS(ESI): m/z ber. für (M+Na⁺): 381,50.

gef. 381,20.

IR (neat): 3273, 1681, 1340, 1222, 1135, 847, 742, 687, 541. 458, 443 cm⁻¹.

CHNS:

ber. für (C₁₆H₁₀N₂S₄): C: 53,60, H: 2,81 %, N: 7,81 %, S: 35,77 %.

gef. 55,10 3,84 6,68 32,24.

(vermutlich Reste von Aceton in der Kristallstruktur präsent)

Lit.: Carpenter *et al.*^[128]

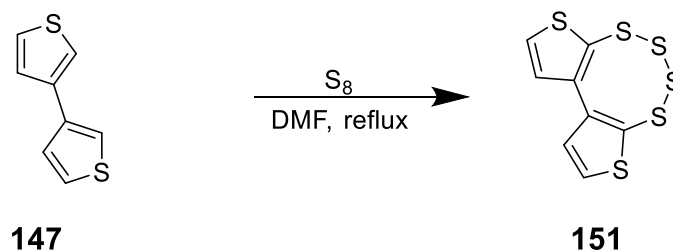
Synthese von Bithiophentetrasulfid (**151**)

Tabelle 45: Ansatz Synthese von Bithiophentetrasulfid.

Stoff	M [g/mol]	n	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
3,3'-Bithiophen	166,26	2 mmol	331 mg			1
Schwefel	32,07	10 mmol	321 mg			5
DMF	-	-	-	-	10 mL	--

Es wurden 3,3'-Bithiophen (331 mg, 2,0 mmol, 1eq) und Schwefel (321 mg, 10,00 mmol, 5eq) in DMF (10 mL) suspendiert und die entstandene Suspension unter Schutzgas für drei Stunden zum Sieden erhitzt. Die Reaktionsmischung ist über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert worden.

Ausbeute: 3,3'-Bithiophentetrasulfid 0 mg.

Es konnten nur sehr geringe Mengen gelber Verbindungen isoliert werden, welche jedoch Gemische vieler Verbindungen und somit nicht analytisch auszuwerten waren.

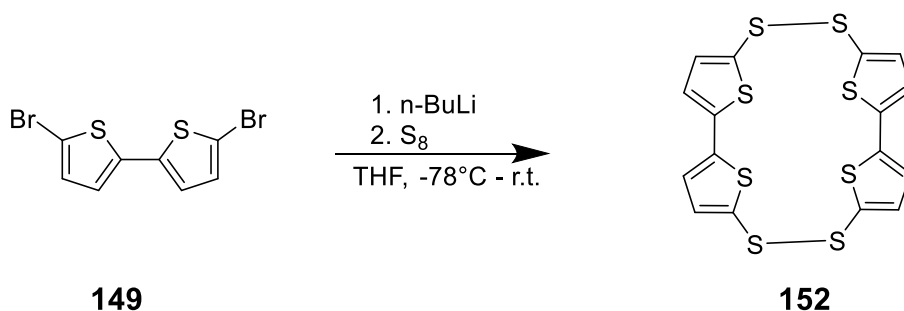
Synthese von Bis-bithiophendisulfid (**152**)

Tabelle 46: Ansatz Synthese Bis-bithiophendisulfid.

Stoff	M [g/mol]	n	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
5,5'-Dibrom-2,2'-bithiophen	324,05	3,9 mmol	1,250 g			1
Schwefel	32,07	15,4 mmol	0,494 g			4
n-BuLi 1,9M		11,6 mmol			6,10 mL	3
THF	-	-	-	-	50 mL	--

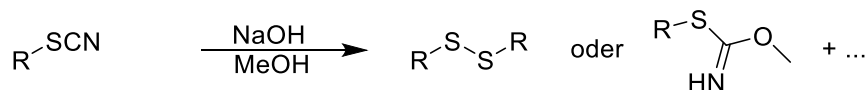
Es wurden 5,5'-Dibrom-2,2'-Bithiophen (1,250 g, 3,85 mmol, 1eq) in THF (50 mL) suspendiert und auf -78°C gekühlt. Anschließend ist nBuLi (6,10 mL, 11,55 mmol 3eq) binnen 10 Min. zugegeben, für weitere 10 Min. bei -78°C gerührt und die Reaktionsmischung für weitere 30 Min. bei Raumtemperatur gerührt worden. Nach erneutem Abkühlen auf -78°C wurde Schwefel (0,494 g, 15,40 mmol, 4 eq) in einer Portion zugegeben und die nun tiefrote Lösung über Nacht gerührt. Es wurde Wasser (40 mL) sowie verdünnte HCl (3 mL) zugegeben und die Lösung für weitere 30 Min. gerührt. Es ist Toluol (50 mL) zugegeben und die organische Phase abgetrennt worden. Die wässrige Phase wurde noch einmal mit Toluol (50 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das rot-orange Rohprodukt durch Säulenchromatographie gereinigt (Silicalgel: 150 mL, d: 60 mm, Laufmittel: Cyclohexan, Flussrate: ~10 mL/Min., verwendete Fraktion: 1-4). Ausbeute: Es bildeten sich höchst komplexe Gemische, die auf einer Kieselgel Normalphase nicht trennbar waren.

Weitere Versuche, mittels direkter Lithiierung die dilithiierte Spezies aus dem entsprechenden Bithiophen zu erhalten, lieferten weniger komplexe Gemische, jedoch nicht das gewünschte Produkt.

3.7 Verschiedene Umsetzungen von organischen Thiocyanaten

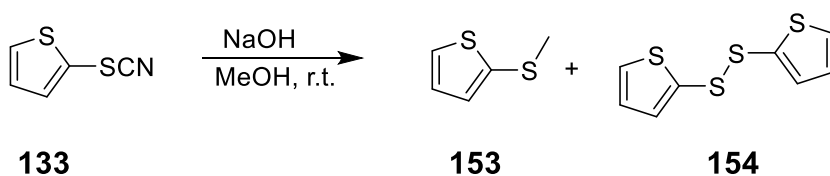
Während der Promotionsarbeit wurden verschiedene Thiocyanate dargestellt, die analog der Synthese des roten Farbstoffs mit NaOH/MeOH umgesetzt wurden.

Generelle Methode:



Zu Thiocyanatverbindung (2,0 mmol, 1 eq) in Methanol (30 mL) wurde NaOH (38 mg, 1 mmol, 0,5 eq) in einer Portion zugegeben. Die Reaktion wurde bis zum Verschwinden des Edukts (TLC) bei Raumtemperatur und in Kontakt mit Luft gerührt. Es wurde Silikagel (Typ: MN SG60, 3 mL) zugegeben und das Lösungsmittel bis zur kompletten Trockenheit am Rotationsverdampfer entfernt. Der "Dryload" wurde durch Säulenchromatographie gereinigt (Silicalgel: 40 mL, d: 20 mm, Laufmittel: Cyclohexan/Ethylacetat-Gemische, Flussrate: ~4 mL/Min., verwendete Fraktion: alle).

Umsetzung von 2-Thiocyanatothiophen



Ausbeute: In MeOH:

93 mg, 0,72 mmol, 36 % 2-Methylthio-thiophen (**155**) (Fraktion 2);

71 mg, 0,31 mmol, 31 %, Thienyldisulfid (**156**) (Fraktion 1).

In Toluol/H₂O:

86 mg, 0,37 mmol, 37 %, Thienyldisulfid (Fraktion 1). (45 % bezogen auf den umgesetzten Anteil an Edukt); 50 mg, 0,35 mmol, 18 %, Edukt 2-Thiocyanatothiophen.

Thienyldisulfid (154)

TLC: 0,56 (Cyclohexan/Ethylacetat 20/1)

NMR:

^1H : (400 MHz CDCl_3): δ 7,49 (d, $J = 5,27$ Hz, 2H), 7,15 (d, $J = 3,66$ Hz, 2H), 7,01 (dd, $J = 5,27$; 3,66 Hz, 2H) ppm.

^{13}C : 101 MHz (CDCl_3): δ 135,8, 132,4, 127,9 ppm.

MS(ESI): m/z $[\text{M}+\text{MeOH}+\text{H}^+]^+$: ber. 262,97, gef. 263,06.

CHNS:

ber. für ($\text{C}_8\text{H}_6\text{S}_4$): C: 41,71 %, H: 2,63 %, S: 55,67 %.

gef. 42,26 2,63 57,53.

Lit.: Sattar *et al.*^[129]

2-Methylthio-thiophen (153)

TLC: 0,55 (Cyclohexan/Ethylacetat 20/1)

NMR:

^1H : (400 MHz CDCl_3): δ 7,29 (d, $J = 4,12$ Hz, 1H), 7,07 (d, $J = 3,66$ Hz, 1H), 6,96 (dd, $J = 4,12$; 3,66 Hz, 1H), 2,49 (s, 3H) ppm.

Lit: Czyz *et al.*^[130]

MS(ESI): m/z $[M+H]^+$: ber. 204,0841, gef. 204,0844.

CHNS:

ber. für (C₁₂H₁₃NS): C: 70,90 %, H: 6,45 %, N: 6,89 %, S: 15,77 %

gef. 70,14 6,34 6,88 15,66.

IR (neat): 2923, 1597, 1515, 1497, 1455, 1433, 1319, 1258, 1133, 1089, 1073, 1034, 958, 879, 797, 761, 717, 692, 644, 619, 606, 557, 486 cm⁻¹.

Es wurde eine weitere tiefgelbe Verbindung isoliert, welche während dem kontrollierten eindampfen von Mischfraktionen als gelbe plattenartige Kristalle anfiel. Da die Struktur noch nicht abschließend geklärt ist wird hierbei auf eine Zuweisung einer Nummer verzichtet. Jedoch wird postuliert, dass es sich um N-Phenylpyrroldisulfid handelt.

¹H: (500 MHz DMSO D₆): δ 7,41 – 7,30 (m, 3H), 7,26 (t, *J* = 2,30 Hz, 1H), 7,18 (d, *J* = 7,73 Hz, 2H), 6,38 (dd, *J* = 3,72, 1,72 Hz, 1H), 6,27 (dd, *J* = 3,44, 2,30 Hz, 1H,) ppm.¹³C: (125 MHz DMSO D₆): δ 139,3, 129,3, 129,0, 128,0, 127,0, 122,4, 121,7, 110,4 ppm.IR (neat): 1594, 1505, 1495, 1451, 1430, 1382, 1317, 1295, 1230, 1202, 1167, 1157, 1141, 1084, 1070, 1033, 1002, 957, 915, 878, 810, 770, 727, 695, 647, 616, 603, 566, 480, 416 cm⁻¹.

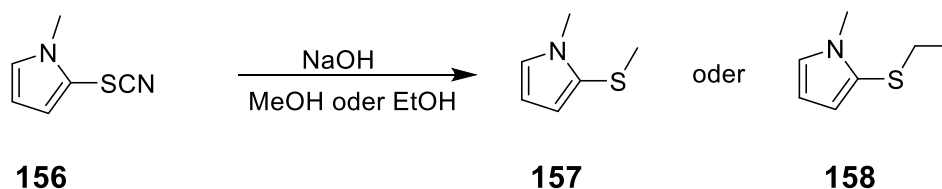
CHNS:

ber. für (C₂₀H₁₆N₂S₂): C: 68,93 %, H: 4,63 %, N: 8,04 %, S: 18,40 %

gef. 67,88 4,70 7,68 17,93.

Umsetzung von N-Methyl-2-thiocyanatopyrrol

Die Reaktion wurde sowohl in Methanol als auch in Ethanol durchgeführt; das Hauptprodukt war jeweils die S-alkylierte Verbindung.



Methylthio-N-methylpyrrol (**157**):

^1H : (400 MHz CDCl_3): δ 6,76 (dd, $J = 2,75, 1,60$ Hz, 1H), 6,34 (dd, $J = 3,66, 1,60$ Hz, 1H), 6,11 (dd, $J = 3,66, 2,75$ Hz, 1H), 3,70 (s, 3H), 2,26 (s, 3H) ppm.

IR (neat): 2919, 2855, 1516, 1459, 1433, 1410, 1389, 1316, 1291, 1086, 1043, 966, 790, 712, 685, 610, 494 cm^{-1} .

CHNS:

ber. für ($\text{C}_6\text{H}_9\text{NS}$): C: 56,65 %, H: 7,13 %, N: 11,01 %, S: 25,20 %

gef. 44,47 5,62 8,20 18,69.

Hierbei ist von einer starken Verdunstung der Verbindung auszugehen, da es sich um die flüchtigste der Alkylthiopyrrole handelt.

Ethylthio-N-methylpyrrol (**158**):

^1H : (400 MHz CDCl_3): δ 6,79 (dd, $J = 2,75, 2,02$ Hz, 1H), 6,38 (dd, $J = 3,66, 2,02$ Hz, 1H), 6,12 (dd, $J = 3,66, 2,75$ Hz, 1H), 3,70 (s, 3H), 2,60 (q, $J = 7,33$ Hz, 2H), 1,20 (t, $J = 7,33$ Hz, 3H) ppm.

^{13}H : (101 MHz CDCl_3): 125,1, 124,9, 117,9, 34,4, 34,1, 31,5 ppm.

MS(ESI): m/z ber. für ($\text{M} + \text{H}^+$): 142,07, gef. 142,21.

IR (neat): 2924, 1459, 1292, 1086, 998, 712, 610, 495 cm^{-1} .

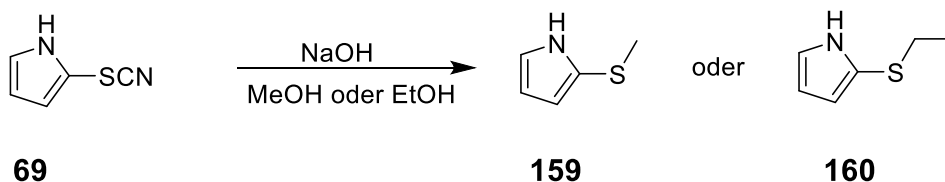
CHNS:

ber. für (C₇H₁₁NS): C: 59,53 %, H: 7,85 %, N: 9,92 %, S: 22,70 %

gef. 61,22 8,38 8,39 19,77.

Umsetzung von 2-Thiocyanatopyrrol

Die Reaktion wurde sowohl in Methanol als auch in Ethanol durchgeführt. Es bildete sich, außer dem roten Farbstoff und den respektiven Carbonimidothioaten, die jeweils S-alkylierten Verbindungen.

Methylthiopyrrol (**159**):

¹H: (400 MHz CDCl₃): δ 8,22 (s, 1H, NH.), 6,819-6,80 (m, 1H, C₅H.), 6,37-6,35 (m, 1H, C₃H.), 6,23-6,20 (m, 1H, C₄H), 2,28 (s, 3H, CH₃) ppm.

¹³H: (101 MHz CDCl₃): 120,4, 119,2, 116,7, 110,1, 21,3 ppm.

MS(ESI): m/z ber. für (M+ MeOH+H⁺): 145,06, gef. 145,12.

IR (neat): 3380, 2920, 1530, 1428, 1405, 1259, 1110, 1075, 1026, 970, 801, 718, 655, 547 cm⁻¹.

CHNS:

ber. für (C₅H₇NS): C: 53,06 %, H: 6,23 %, N: 12,38 %, S: 28,33 %

gef. 51,89 6,24 11,37 25,80.

Ethylthiopyrrol (**160**):

^1H : (400 MHz CDCl_3): δ 8,23 (s, 1H), 6,89 - 6,75 (m, 1H), 6,42 – 6,35 (m, 1H), 6,25-6,15 (m, 1H), 2,65 (q, $J = 7,33$ Hz, 2H), 1,21 (t, $J = 7,33$ Hz, 3H) ppm.

^{13}H : (101 MHz CDCl_3): 120,4, 119,2, 116,7, 110,1, 32,0, 15,6 ppm.

MS(ESI): m/z ber. für ($\text{M} + \text{H}^+$): 128,05, gef. 128,10.

IR (neat): 3386, 2925, 1529, 1259, 1185, 1111, 1026, 1075, 1025, 803, 718, 656, 544 cm^{-1} .

CHNS:

ber. für ($\text{C}_6\text{H}_9\text{NS}$): C: 56,65 %, H: 7,13 %, N: 11,01 %, S: 25,20 %.

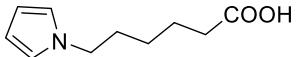
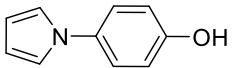
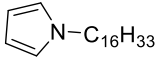
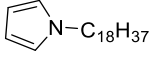
gef. 49,14 6,19 9,50 21,74. (flüchtig)

3.8 Synthese von N-substituierten Pyrrolen für die Oberflächenmodifikation

Generelle Methode:

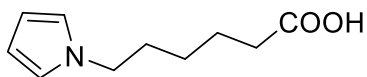
Die Aminoverbindung (35 mmol, 1 eq) wurde zusammen mit Natriumacetat (35 mmol, 1eq) und THABr (200 mg, 0,2 mmol, 0.6 mol%) als Phasentransferkatalysator zu einem Gemisch aus dest. H_2O Essigsäure (40 mL H_2O , 25 mL HOAc) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde mit Toluol (80 mL) überschichtet und unter Erhitzen Dimethoxytetrahydrofuran (38,5 mmol, 1.1 eq) binnen 15 Min. zugetropft sowie für 4 - 6 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Die organische Phase wurde nach Abkühlen der Reaktion auf Raumtemperatur separiert, die wässrige Phase mit Toluol extrahiert (2x 50 mL), die). Die organischen Phasen sind vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet worden. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (200 mL Silikagel, Flussrate 20 ml/Min) gereinigt wobei als Eluenten Cyclohexan/Ethylacetat Gemische verwendet wurden.

Tabelle 47: Ausbeuten einiger nach obiger Methodik synthetisierter NSP's.

Struktur Laufzahl	Pyrrol Struktur	Ausbeute
161		95 %
162		67 %
163		73 %
164		98 %

Somit sind nach obigen Ausbeuten die Ergebnisse der zweiphasigen Synthese als konsistent sehr gut zu bezeichnen, auch die erleichterte Extraktion und die somit höhere Effizienz der Methodik sind als große Verbesserung zu bewerten.

6-(1*H*-Pyrrol-1-yl)hexansäure (**161**)

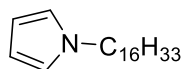


^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , δ): 11,94 (s, 1H; COOH), 6,68 (t, $J = 2,1, 2.3$ Hz, 2H; Pyrrol C₂H + C₅H), 5,92 (t, $J = 2,1, 2,3$ Hz, 2H; Pyrrol C₃H + C₄H), 3,81 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H; NCH₂), 2,14 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H; CH₂COOH), 1,64 (tt, $J = 7,3, 7,6$, Hz, 2H; C₅H₂), 1,47 (tt, $J = 7,6, 7,8$ Hz, 2H; C₃H₂), 1,18 (m, 2H; C₄H₂) ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6 , δ): 176,30 (COOH), 120,09 (pyrrole C₂ + C₅), 107,32 (pyrrole C₃ + C₄), 48,78 (NCH₂), 33,59 (CH₂COOH), 31,19 (NCH₂CH₂), 25,97 (NC₂H₄CH₂), 24,35 (CH₂CH₂COOH) ppm.

IR (neat): $\nu = 2933$ (m), 2865 (w), 1702 (s), 1500 (m), 1411 (m), 1280 (s), 1088 (m), 1060 (m), 936 (m), 719 (s), 651 (w), 616 (m).

MS (ESI) m/z : $[\text{M} - \text{H}]^-$ ber. 180,11; gef 180,23.

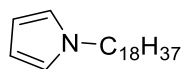
1-Hexadecyl-1*H*-pyrrol (**162**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ): 6,66 (t, $J = 2,0, 2,3$ Hz, 2H; Pyrrol $\text{C}_2\text{H} + \text{C}_5\text{H}$), 6,14 (t, $J = 2,0, 2,3$ Hz, 2H; Pyrrol $\text{C}_3\text{H} + \text{C}_4\text{H}$), 3,87 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H; NCH_2), 1,76 (quint., $J = 7,2$ Hz, 2H; NCH_2CH_2), 1,29 (m, 28H; 14 CH_2), 0,90 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H; CH_3) ppm.

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3 , δ): 120,53 (Pyrrol $\text{C}_2 + \text{C}_5$), 107,83 (Pyrrol $\text{C}_3 + \text{C}_4$), 49,74 (NCH_2), 31,91 (NCH_2CH_2), 31,70 ($-\text{CH}_2-$), 29,81 (3 $-\text{CH}_2-$), 29,77 ($-\text{CH}_2-$), 29,74 ($-\text{CH}_2-$), 29,68 ($-\text{CH}_2-$), 29,61 ($-\text{CH}_2-$), 29,48 ($-\text{CH}_2-$), 29,33 ($-\text{CH}_2-$), 27,02 ($-\text{CH}_2-$), 26,89 ($-\text{CH}_2-$), 22,82 (CH_2CH_3), 14,24 (CH_3) ppm.

IR (neat): $\nu = 2915$ (s), 2848 (s), 1500 (m), 1472 (m), 1463 (m), 1283 (m), 1092 (m), 1061 (m), 719 (s), 617 (m).

MS (ESI) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ ber. 292,29; gef 292,37.

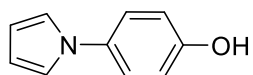
1-Octadecyl-1*H*-pyrrol (**163**)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ): 6,66 (t, $J = 2,0, 2,0$ Hz, 2H; Pyrrol $\text{C}_2\text{H} + \text{C}_5\text{H}$), 6,15 (t, $J = 2,0, 2,0$ Hz, 2H; Pyrrol $\text{C}_3\text{H} + \text{C}_4\text{H}$), 3,87 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H; NCH_2), 1,77 (quint., $J = 6,87$ Hz, 2H; NCH_2CH_2), 1,27 (m, 32H; 16 CH_2), 0,91 (t, $J = 6,87$ Hz, 3H; CH_3) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ): 120,55 (Pyrrol $\text{C}_2 + \text{C}_5$), 107,84 (Pyrrol $\text{C}_3 + \text{C}_4$), 49,75 (NCH_2), 32,05 (NCH_2CH_2), 31,71 ($-\text{CH}_2-$), 29,83 (4 CH_2-), 29,79 (3 CH_2-), 29,74 ($-\text{CH}_2-$), 29,68 ($-\text{CH}_2-$), 29,61 ($-\text{CH}_2-$), 29,48 ($-\text{CH}_2-$), 29,34 ($-\text{CH}_2-$), 26,89 ($-\text{CH}_2-$), 22,82 (CH_2CH_3), 14,25 (CH_3) ppm.

IR (neat): Nicht von 1-Hexadecyl-1*H*-pyrrol zu unterscheiden; MS (ESI) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ ber. $\text{C}_{22}\text{H}_{41}\text{N}$, 320,32; gef. 320,43.

(1*H*-Pyrrol-1-yl)-phenol (**164**)



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ): 7,26 (m, 2H, ph. C_{3+5}H), 6,98 (t, $J = 2,29$ Hz, 2H; Pyrrol C_{2+5}H), 6,87 (m, 2H; ph. C_{2+6}H), 6,32 (m, 2H; Pyrrol. C_{3+4}H), 4,83 (s, 1H; OH) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , δ): 153,64 (ph. COH), 134,78 (ph. CN), 122,52 (ph. C_{3+5}H), 119,80 (Pyrrol 2 NCH), 116,19 (ph. C_{2+6}H), 109,95 (Pyrrol CH) ppm.

MS (ESI) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$: ber. 160,19; gef. 160,14.

3.9 Synthese von Goldnanopartikeln

Turkevich: Zu 24,75 mL kochender Natriumcitratlösung (1 mg/mL) wurden 0,25 mL HAuCl_4 Lösung (aq.) (10 mg/mL) in einer Portion unter starkem Rühren zugegeben. Die Reaktion wurde für 15 Min. zu gelindem Sieden erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die tiefrote Suspension wurde durch einen 45 nm sterilen Spritzenfilter filtriert, um größere Partikel, die als Keime für die Agglomeration dienen könnten, zu entfernen. Die Nanopartikel wurden bei 4 °C gelagert und waren bis über ein Jahr hinweg stabil. Die Größe der mit dieser Methodik gewonnen Nanopartikeln lag bei ca. 20 – 30 nm.^[131]

Invers Turkevich: Zu 23,75 mL wässriger HAuCl_4 Lösung (0,0526 mg/mL) wurde bei 95 °C, 1,25 mL Natriumcitratlösung (10 mg/mL) in einer Portion zugegeben. Die Reaktion wurde für 15 Min. zu gelindem Sieden erhitzt und sodann auf Raumtemperatur abgekühlt. Die tiefrote Suspension wurde durch einen 45 nm sterilen Spritzenfilter filtriert, um größere Partikel, die als Keime für die Agglomeration dienen könnten, zu entfernen. Die Nanopartikel wurden bei 4 °C gelagert und waren bis über ein Jahr hinweg stabil. Die Größe der mit dieser Methodik gewonnen Nanopartikeln lag bei zumeist ca. 10 – 15 nm.^[132]

Die Größe der Nanopartikel wurde durch die von Haiss *et al.* etablierte Methode bestimmt.^[133]

3.10 Synthese von Thiol- und Carboxymethyl- modifizierten Polysacchariden

Es wurden hierfür verschiedene, kommerziell zu erwerbende Polysaccharide ausgesucht. Bei den ausgesuchten Sacchariden handelte es sich um Dextran, Pullulan, Inulin sowie (+) Arabinogalactan.

Die Methodik der Modifikation war für alle Zucker identisch, weshalb hier die allgemeine Methode angegeben wird:

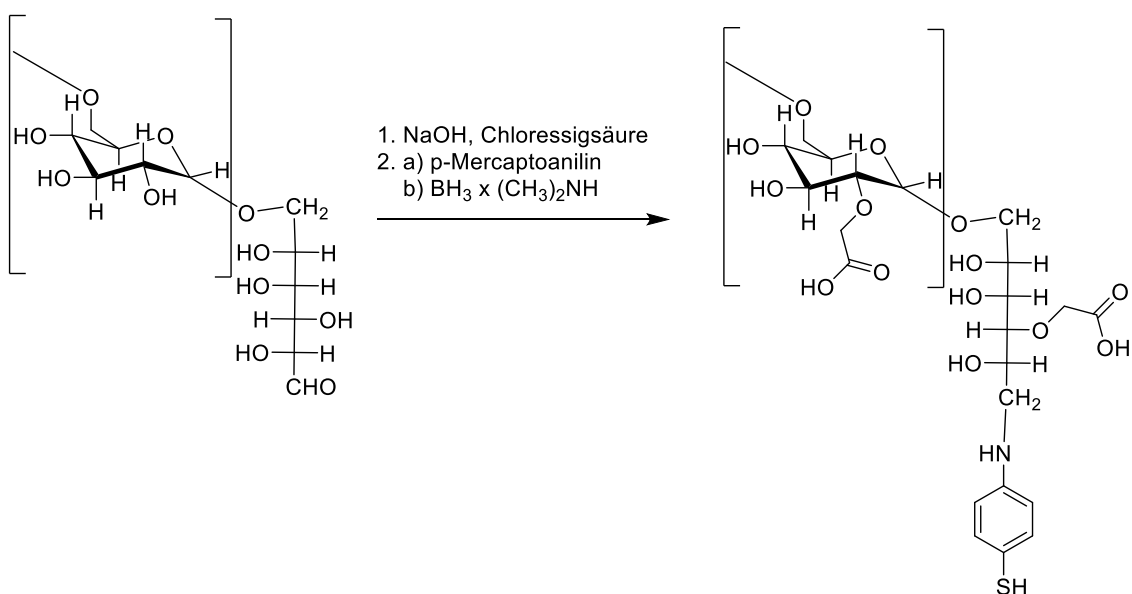


Tabelle 48: Carboxymethylierung von Polysacchariden.

Stoff	M [g/mol]	n	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
Polysaccharid	-	-	3,400 g	-		
Chloroessigsäure	94,50	80 mmol	7,560 g	1,58		
NaOH	40,00	160	6,400 g	-		

Zu dem in Wasser (40 mL) gelösten Polysaccharid (3,400 g) wurde langsam unter Kühlung Natriumhydroxyd (6,400 g, 160 mmol) zugegeben. Ebenfalls unter Kühlung in einem Wasserbad wurde Chloressigsäure (7,560 g, 80 mmol) in Portionen binnen 15 Min. zugegeben. Das Kühlbad wurde entfernt, die Reaktionsmischung auf 90°C erhitzt und für 5 Std. auf dieser Temperatur gehalten. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde dem Ansatz langsam Methanol (50 -100 mL) unter starkem Rühren zugegeben. Nach Kühlung zur Vervollständigung der Fällung wurde das Produkt scharf abgesaugt und mit Methanol (3x 50 mL) nachgewaschen.

Die so erhaltenen Produkte wurden in einem weiteren Schritt mit p-Mercaptoanilin durch eine reduktive Aminierung modifiziert, um die an die Goldsensoroberfläche koordinieren zu können.

Tabelle 49: Thiol-Modifikation von Polysacchariden.

Stoff	M [g/mol]	n	m	ρ [g/cm ³]	V	eq
CM-Polysaccharid	-	-	0,400 g	-		
Dimethylaminoboran	58,92	0,36 mmol	21,0 mg			
Mercaptoanilin	139,22	0,18 mmol	25,0 mg	-		

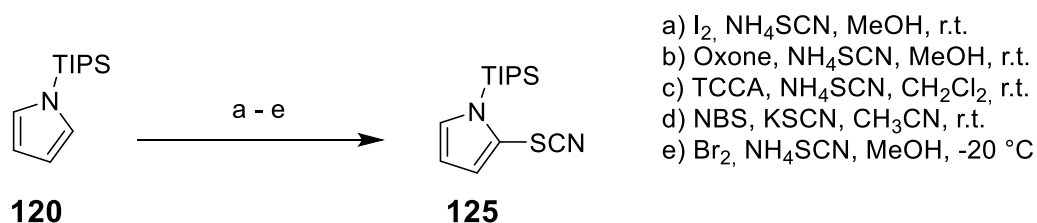
Zu dem in Wasser (5,0 mL) gelösten CM-Polysaccharid (0,400 g) wurde Mercaptoanilin (25,0 mg, 0,18 mmol), gelöst in Essigsäure (4,5 mL), versetzt. Die Lösung wurde für eine Std. bei gelegentlichem Schwenken bei R.T. inkubiert und anschließend mit Dimethylaminoboran (21,0 mg, 0,36 mmol) versetzt, das Reaktionsgefäß mit Stickstoff gespült, dicht verschlossen und so für 4 Std. bei 50°C inkubiert. Die Reinigung des Produktes wurde mittels Zentrifugalfiltern durchgeführt (5000 Da, 5000 xG), wobei mit demineralisiertem Wasser bis zum Verschwinden des Essig- und Thiol-Geruches nachgefüllt wurde. Die klaren MA - CM Lösungen sind nach Verdünnung direkt für SPR-Messungen verwendet worden.

4 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse wurden wie folgt gegliedert: Als erstes Kapitel wurden die Ergebnisse der während der Promotion durchgeführten Synthesen zusammengefasst. Das zweite und dritte Kapitel behandeln die Extraktion sowie die Analyse der aus *Allium*-Spezies extrahierten Verbindungen. Hierbei ist anzumerken, dass sowohl die Analytik der Naturstoffe als auch der synthetische Teil die zentralen Betätigungsfelder der Arbeit waren. Da jedoch der wohl etwas größere Teil der Zeit in den Bereich der organischen Chemie investiert wurde, stellt dies das eröffnende Kapitel dar. In den beiden letzten Kapiteln wird zum einen die Synthese von Pyrrolverbindungen und zum anderen die von Naturstoffen der Gattung *Allium* inspirierte Entwicklungen von Oberflächen für die Biosensorik dargestellt.

4.1 Syntheserouten verschiedener Pyrrol- sowie heteroaromatischer Schwefelverbindungen

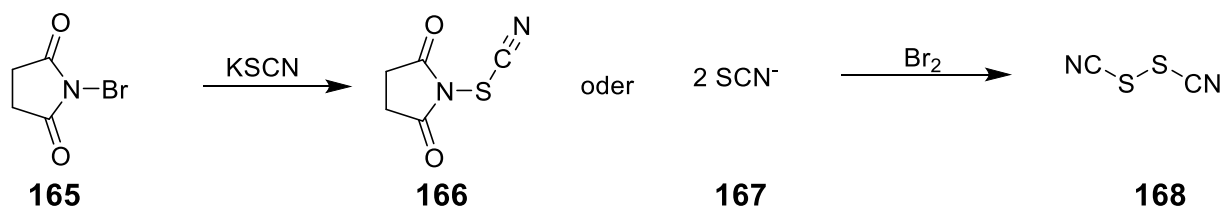
Die Annahme, dass die C-S Bindung des Pyrrols an Position C-3 liegen könnte, führte zu einer intensiven Betrachtung der gezielten Substitution an dieser Position. Es zeigte sich, dass Tipspyrrol einer der aussichtsreichsten Kandidaten für eine erfolgreiche Darstellung von 3-Thiopyrrolen sein müsste. Es wurden während der Promotionsarbeit fünf verschiedene Varianten der Thiocyanierung (Schema 19) verwendet, um 3-Thiocyanato-tipspyrrol darzustellen, jedoch konnten bestenfalls lediglich Spuren des gewünschten Produktes erhalten werden.



Schema 19: Thiocyanierungsmethoden für Tipspyrrol.

Besonders große Hoffnungen, hinsichtlich einer selektiven Reaktion an der Position C-3 des Tipspyrrol, wurden in die Methode **d** gesetzt. Hierbei ist zu erwarten, dass sich aus NBS bzw. alternativ NCS das N-substituierte Produkt bildet (NSCNS), welches in

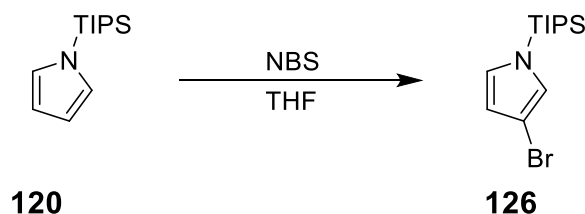
Begleitversuchen gezielt synthetisiert und auch für Thiocyanierungsversuche eingesetzt wurde (Schema 20). Jedoch kann auch erwartet werden, dass sich während der Reaktion durch die Oxidation von Thiocyanat-Ionen mittels Brom, Thiocyanogen bildet.



Schema 20: Bildung von NSCNS bzw. Thiocyanogen.

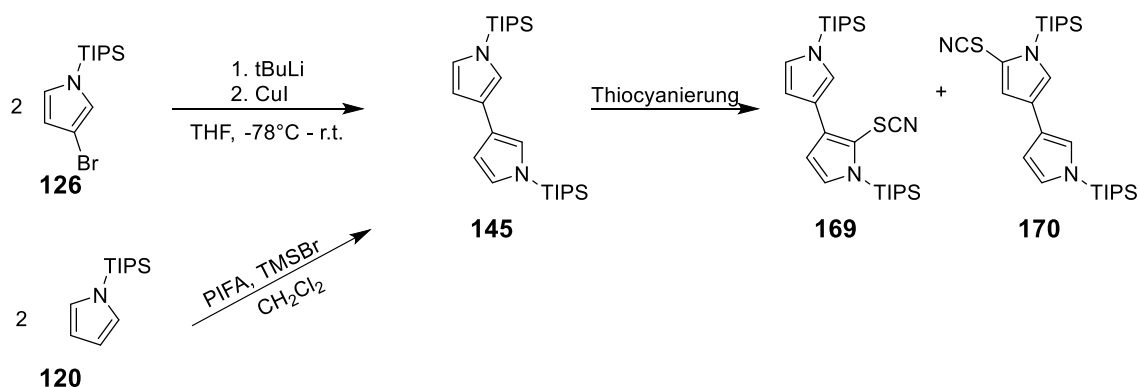
Jedoch zeigte sich hierbei, dass sowohl das *in situ* erzeugte Reagenz als auch das *a priori* hergestellte Reagenz lediglich zu einem 2-substituierten Produkt führten. Zusätzlich dazu wurde eine weitere Beobachtung für die Methode **a** gemacht. Hierbei wird die Verbindung nach 6 Std. Reaktionsdauer vollständig desilyliert. Das Produkt 2-Thiocyanatopyrrol fällt hierbei in hohen Ausbeuten >70 % an.

Die Bromierung der Verbindung hingegen verläuft glatt und in hohen Ausbeuten zu 3-Bromtipspyrrol (Schema 21).



Schema 21: NBS Bromierung von Tipspyrrol.

Es wurde bei dieser Reaktion Ausbeuten > 80 % erhalten. Bei keinem der durchgeführten Experimente konnte ein Hinweis auf das Vorhandensein einer größeren Menge von 2-Bromtipspyrrol erhalten werden. Somit wurde die Methodik verändert und versucht, ausgehend von 3-Bromtipspyrrol, zum entsprechenden Bitipspyrrol zu gelangen bzw. auch durch die direkte oxidative Kupplung mittels PIFA, um dieses dann im Anschluss weiter umzusetzen (Schema 22).

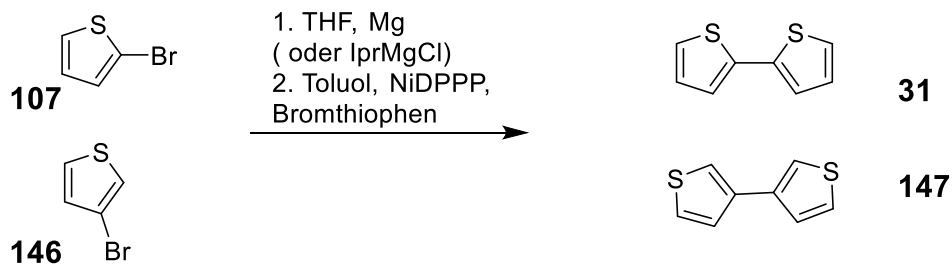


Schema 22: Syntheseweg zur Darstellung von Bitipyrrol und seinen thiocyanierten Folgeprodukten.

Übergangsmetallkatalysierte Methoden wie Palladium katalysierte Methoden (PEPPSI), die z. B. Hajipour et *al.* beschrieben, wurden während der Promotionsarbeit verwendet. Sie zeigten jedoch weder bei den Ausbeuten noch bei der Handhabbarkeit Vorteile gegenüber kupferkatalysierter Variante.^[134]

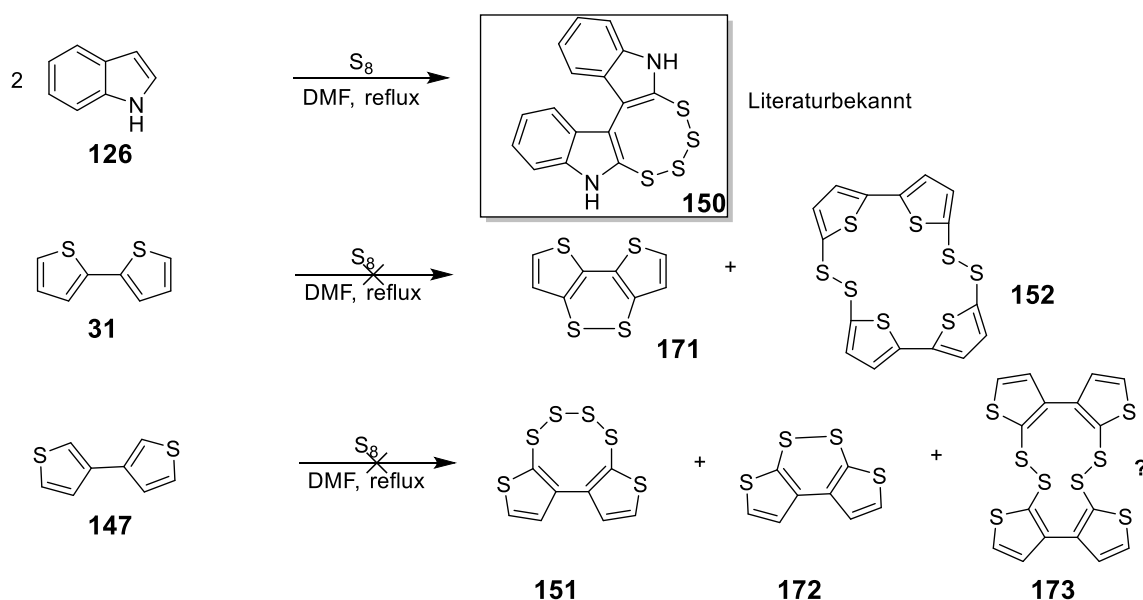
Beide Reaktionen lieferten annehmbare Ausbeuten (40 – 70 %); jedoch war das Produkt nur schwierig von Tipspyrrol durch säulenchromatographische Verfahren zu trennen, weshalb die Ullmann-artige Kupplung mit Kupferiodid bevorzugt eingesetzt wurde. Es stellte sich zudem heraus, dass die oxidative Kupplung mittels PIFA schon bei sehr niedrigen Temperaturen ~ -20 °C durch Zugabe einer Base gequenched werden musste, da sonst ein hoher Anteil an polymerisiertem Produkt entstand und weiterführend durch die entstehende Trifluoressigsäure auch ein Teil des Produktes desilyliert wurde. Die dritte Methode mittels Palladium-katalysierter C-C-Kopplung lieferte vergleichbare Ausbeuten wie die über Kupferorganyle verlaufende Variante. Es mussten bei Ullmann-artigen Kopplungen jedoch kein t-BuLi bei Raumtemperatur eingesetzt werden, was die Gefahr eines Unfalls, vor allem bei größeren Ansätzen, deutlich verringert.

Die Nickel-katalysierte Synthese des Schwefelanalogs 2,2'-Bithiophen war wesentlich einfacher durchzuführen, da die Grignardverbindungen (Thienyl-2 und 3-magnesiumbromid via IprMgCl) gut zugänglich war (Schema 23).



Schema 23: Synthese 2,2' und 3,3'-Bithiophen.

Diese Verbindungen sollten analog zur Synthese von Biindoltetrasulfid weiter umgesetzt werden (Schema 24).



Schema 24: Reaktionen von Indol und Bithiophenen mit Schwefel sowie ihre möglichen Produkte.

Schroth *et al.* konnten zeigen, dass sich, anstelle der analogen Verbindung von **172**, ein 12-gliedriges Bisdisulfid **173** bildet. Die mit 2,2'-Bithiophen durchgeführten Reaktionen lieferten keine schwefelhaltigen Produkte. Hierbei konnte das Edukt nahezu quantitativ zurückgewonnen werden. Reaktionen von 3,3'-Bithiophen zeigten auch eine geringe Reaktivität, lieferten hingegen auch komplexe Mischungen diverser potentiell schwefelhaltige Verbindungen, welche jedoch nicht isoliert werden konnten. Für die Umsetzung der dilithiierten Spezies von 2,2'-Bithiophen und anschließender Umsetzung mit Schwefel konnte durch fraktionierte Kristallisation aus Cyclohexan binnen 3 Wochen ein relativ großer Einkristall erhalten werden. Andere Fraktionen der durch säulenchromatographische Verfahren untrennbaren Mischung lieferten auch Kristalle, wobei die einzelnen

Kristalltypen klar zu unterscheiden waren. So kristallisierten das Edukt Dibrombithiophen sowie dessen Alkylierten Produkte nadelartig, wohingegen gelbe, schwefelhaltige Produkte kubische Kristalle lieferten (Abb. 21).

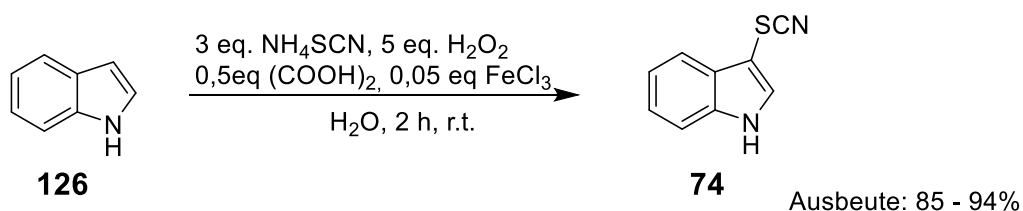


Abbildung 21: Schwefelhaltige Verbindung nach fraktionierter Kristallisation aus Cyclohexan.

Die literaturbekannte Reaktion von Indol mit Schwefel wurde überprüft und lieferte das erwartete Produkt in hohen Ausbeuten. Sowohl das Tetrasulfid als auch das durch Reduktion dieser Verbindung mit anschließender Oxidation durch Luftsauerstoff gewonnene Dithiin waren gelbe, kristalline Produkte und zeigten nicht die nach Jedelska und Kubec *et al.* zu erwartende rote Farbe der typischen Dithiine.^[128,16]

Indol wurde aufgrund seiner wesentlich höheren Stabilität, verglichen mit Pyrrol, als Modell-Substanz für Thiocyanierungen und die darauffolgenden Reaktionen verwendet, um gegebenenfalls Parameter anzupassen bzw. zu optimieren.

Es wurde während der Promotion eine ökonomisch vorteilhafte „Eintopfreaktion“ entwickelt, welche 3-Thiocyanatoindol (**74**) in guten Ausbeuten und mit geringem Zeitaufwand lieferte (Schema 25)

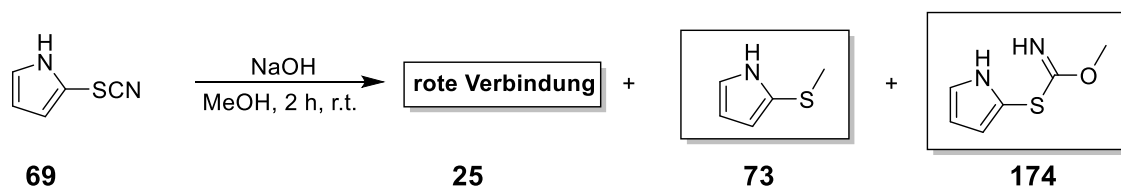


Schema 25: Entwickelte Indol Thiocyanierungs-Methode.

Hierbei konnten die Ausbeuten auf bis zu 98 %, bezogen auf das umgesetzte Indol (**126**), erreicht werden, da die säulenchromatographischen Reinigung des Produktes Indol (erste Fraktion) gesammelt und wiederverwendet werden konnte. Nach der Reaktion konnte das Rohprodukt als runde Feststoff-Agglomerate von leicht bräunlicher Farbe isoliert werden. Das Rohprodukt hatte eine Reinheit von ~90 % (^1H NMR) und könnte theoretisch für weitere, weniger störanfällige, Reaktionen direkt verwendet werden. Die Hauptverunreinigung des Rohproduktes stellte nicht abreagiertes Indol dar.

Die zuvor dargestellte Reaktion war für die Herstellung von Pyrrol-Thiocyanaten jedoch nur bedingt geeignet. Es bildeten sich bei der Verwendung von Pyrrolen als Substrat ein relativ hoher Anteil an polymerisiertem Pyrrol bzw. die Reaktion zeigte hierbei ein hohes Maß an Nebenreaktionen, die nicht zu den gewünschten Produkten führten. Die Ausbeute blieb für alle eingesetzten Pyrrole weit unter 50 %. Die beiden am häufigsten für die Thiocyanierung von Pyrrolen genutzten Oxidationsmittel waren Iod und Oxone, wobei beide Reaktionen unter mäßiger Skalierbarkeit litten und somit für größere Ansätze >20 mmol zwar akzeptable, aber keine guten Ausbeuten lieferten.

Die so gewonnen organischen Thiocyanate wurden verschiedenen Reaktionsbedingungen unterworfen, um im Idealfall direkt die Endprodukte (Dithiine bzw. Bisdisulfide) via Sulfensäure, Disulfid oder Thiosulfinat zu erhalten. Während der Forschung bezüglich der Reaktivität dieser Verbindungen wurde festgestellt, dass die Reaktion von 2-Thiocyanatopyrrol in mit Natriumhydroxyd versetztem Methanol direkt zu farbigen Produkten sowie verschiedenen Nebenprodukten führt, welche keine Färbung aufwiesen. Im Detail ließen sich drei verschiedene Produkte gut isolieren und charakterisieren (Schema 26).



Schema 26: Produkte der Umsetzung von 2-Thiocyanatopyrrol mit NaOH in Methanol.

Hierbei stellte der Methylthioether das Hauptprodukt dar. Die gleichen Produkte hatten sich auch bei der Reduktion der Thiocyanate mittels einem halben Äquivalent Natriumborohydrid isolieren lassen. Eine Erhöhung der NaBH_4 -Äquivalente auf zwei, dementsprechend eine stärkere reduktive Umgebung, führte dazu, dass sich lediglich der Methylthioether sauber isolieren ließ. Besonders die rote Verbindung fehlte vollständig, was bei der säulenchromatographischen Aufarbeitung der Ansätze rein visuell festgestellt werden konnte. Es konnten für alle eingesetzten Pyrrolverbindungen sowohl der Methylthioether als auch das Carbonimidodithioat (**174**) (*Riemschneider* Produkt) isoliert werden.

Es gelang jedoch für keines der N-substituierten Thiocyanatopyrrole eine farbige Verbindung, deren R_f -Wert, ähnlich dem der zuvor isolierten roten Verbindung, zu isolieren. Es bildeten sich instabile blaue Verbindungen, die für fast alle N-Substituierten Pyrrolthiocyanate beobachtet werden konnten (Abb. 22).

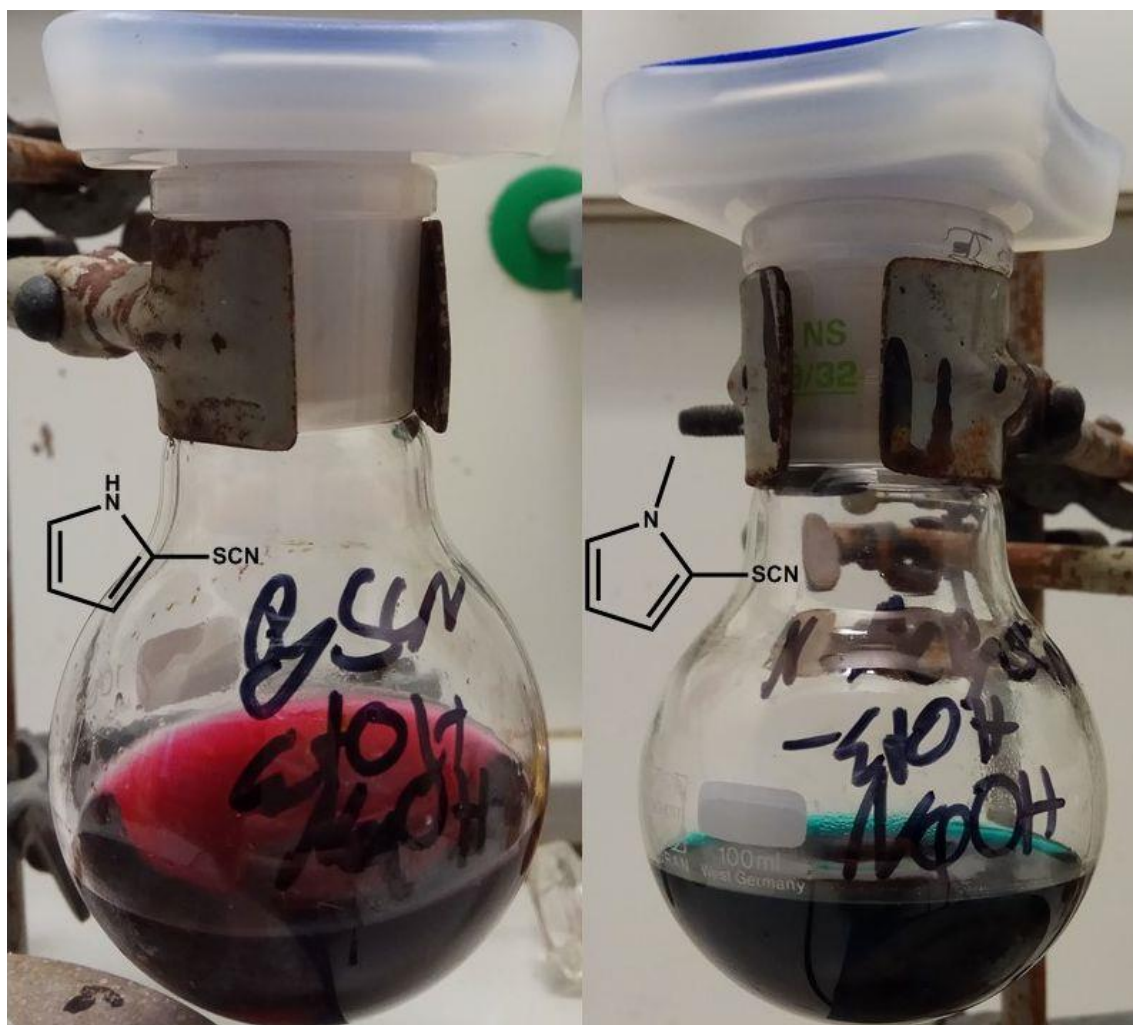
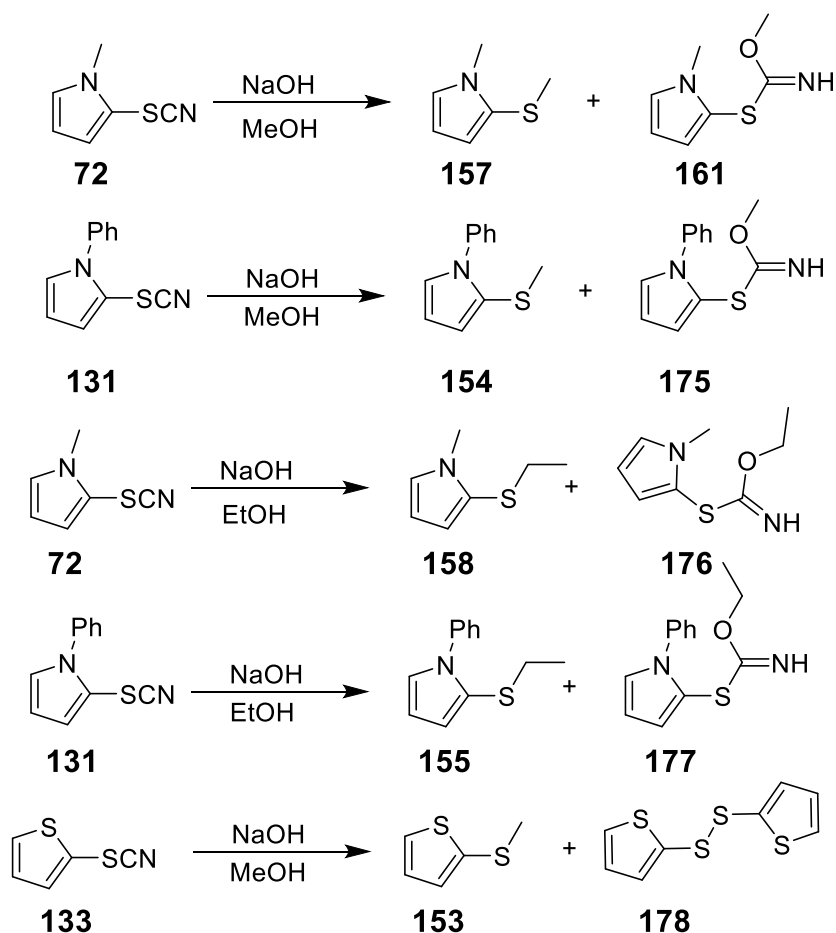


Abbildung 22: Farbverlauf für 2-Thiocyanatopyrrol (links) sowie N-Methyl-2-thiocyanatopyrrol (rechts) bei der Umsetzung mit NaOH in Ethanol.

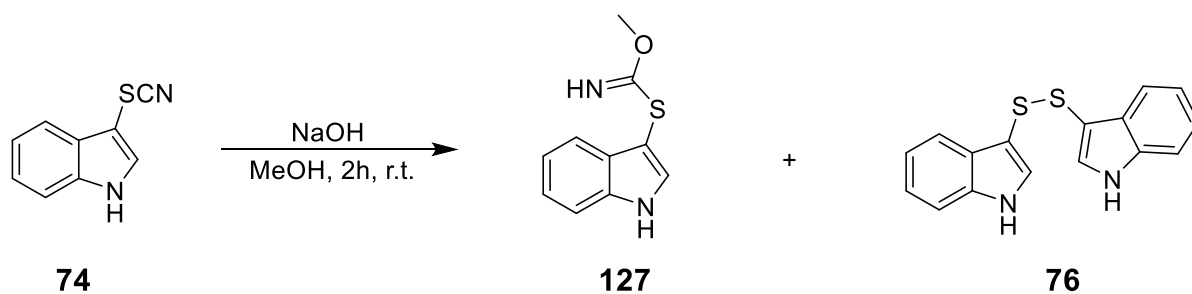
Es bildeten sich auch verschiedenfarbige, potentiell polymere Produkte, die jedoch nicht genauer untersucht wurden. Dieselben Produkttypen konnten auch in Ethanol als Lösungsmittel erhalten werden. Es bildeten sich hauptsächlich der entsprechende Ethylthioether sowie das Ethyl-Carbonimidothioat (Schema 27). Die Umsetzung von 2-Thiocyanatothiophen lieferte teils rote und orange Verbindungen nach Umsetzung mit NaOH/MeOH. Jedoch handelte es sich um geringe Spuren, sodass keine Strukturaufklärung dieser Substanzen möglich war. Gut isoliert werden konnten die Hauptprodukte 2-Methylthiothiophen sowie Thienyldisulfid, die bei der Umsetzung in Methanol in einer ca. 1:1 Mischung anfielen. Bei der Umsetzung in einem zweiphasigen System Toluol/H₂O/NaOH entstand ausschließlich Thienyldisulfid.



Anmerkung: Die Carbonimidothioate wurden zum Teil nicht isoliert.

Schema 27: Bildung von Thioethern, Disulfiden sowie Carbonimidothioaten in Methanol und Ethanol.

Die Reaktion der Indolverbindung unter diesen Bedingungen unterschied sich deutlich von den zuvor dargestellten. Das Hauptprodukt hierbei war 3,3'-Indolyldisulfid, sowohl für die Hydrolyse in Methanol als auch für die NaBH₄ Reduktion in Methanol bzw. Ethanol. Als Nebenprodukt, welches nur einen geringen Anteil darstellte, wurde das Carbonimidothioat identifiziert (Schema 28).



Schema 28: Produkte der alkalischen Hydrolyse von 3-SCN-Indol in Methanol.

Versuche, eine weitere farbige Verbindung, außer den durch die Reaktion mit Schwefel in DMF darzustellen, scheiterten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine neue, der Riemschneiderreaktion ähnliche Umsetzung, gefunden wurde, bei der auch primäre Alkohole zur Reaktion kommen. Bei den Produkten der an dieser Stelle, „pseudo Riemschneiderreaktion“ genannten Synthese handelt es sich um Carbonimidothioate, die in mäßigen Ausbeuten anfallen, wobei die Reaktion hinsichtlich dieser Produkte jedoch nicht auf Ausbeute optimiert wurde.

Bei den Umsetzungen von organischen Thiocyanaten kommt es zu komplexen Reaktionen, wobei bei den Umsetzungen in alkoholischen Lösungen Thioether des entsprechenden Lösungsmittels Ausbeuten von ca. 20 – 50 % anfallen. Auch bei dieser Reaktion sind keine Literaturquellen zu finden, die ähnliche Phänomene ohne die Zugabe eines Alkylhalogenides beschreiben.

Die Bildung von farbigen, gering polaren Makrocyclen gelang nur für die Umsetzung von 2-Thiocyanaopyrrol. Weniger reaktive aromatische Thiocyanate liefern als Produkt lediglich die entsprechenden Disulfide, welche wohl im Falle der Pyrroldisulfide reaktiv genug sind, um schnell hydrolysiert zu werden und in weiteren Reaktionen unter CC-Bindungsknüpfung zu kondensieren.

Es wurden Versuche angestellt, verschiedene Pyrrol-Disulfide darzustellen, jedoch zeichneten Pyrrol-Disulfide sich durch ihr geringe Stabilität aus und polymerisierten auch bei Lagerung bei -25 °C binnen weniger Monate. Die Reaktivität von Thiophendisulfid sowie Benzylidisulfid wurde massenspektrometrisch untersucht. Hierbei zeigte sich, dass sich unter den Bedingungen, die auch für die Synthese des roten Farbstoffes gewählt wurden, verschiedene Hydrolyseprodukte entstehen, also eine Disproportionierung der Disulfide zur Folge hat.

Dies konnte besonders ausgeprägt für Thienyldisulfid beobachtet werden (Abb. 23).

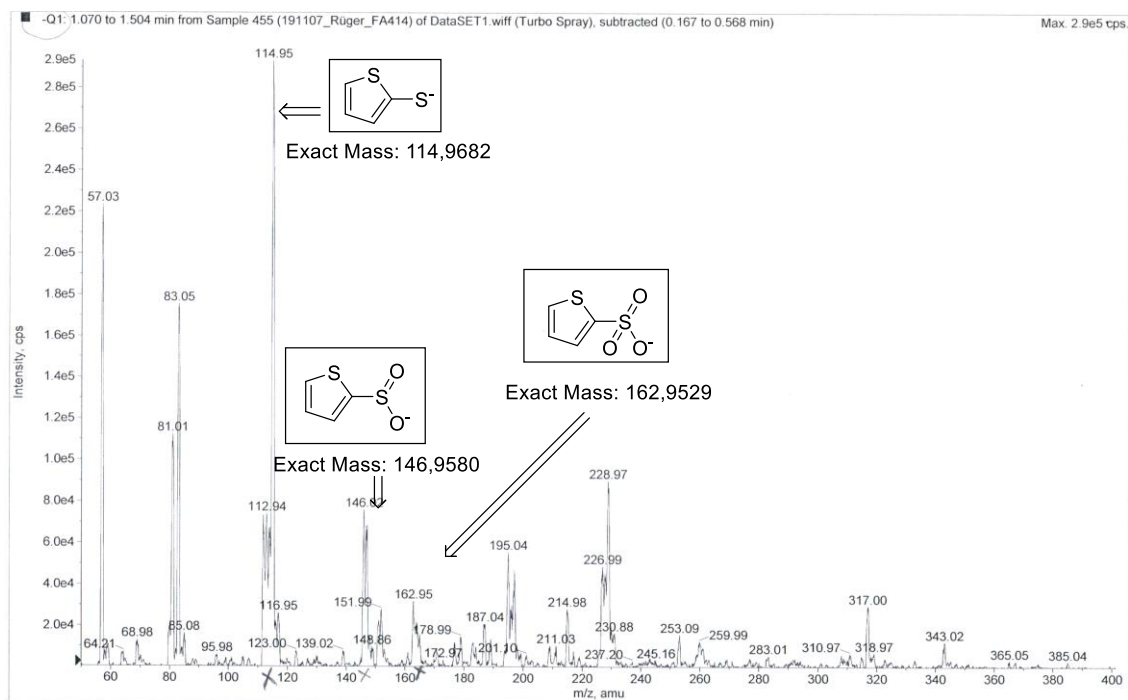
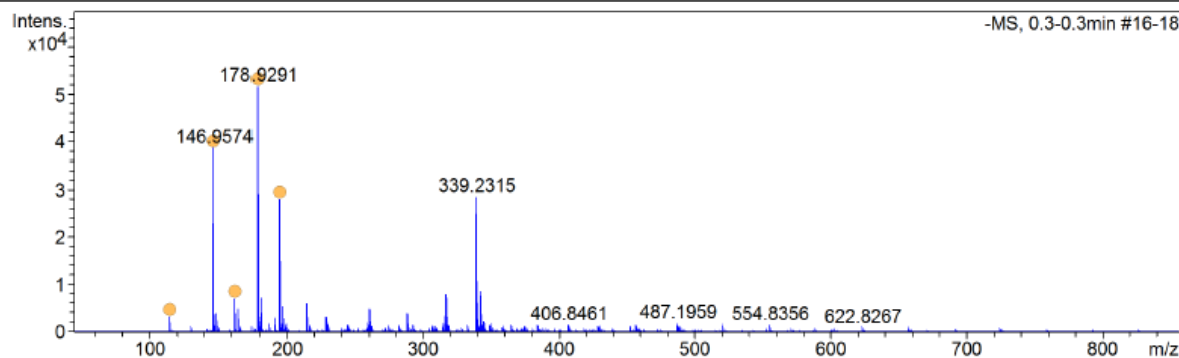


Abbildung 23: Hydrolyse- bzw. Disproportionierungsprodukte bei der Umsetzung von Thienyldisulfid mit MeOH/NaOH.

Auch Benzylidisulfid zeigte eine gewisse Hydrolyseempfindlichkeit bei den für Thienyldisulfid gewählten Bedingungen. Dabei konnten lediglich Spuren des Benzylsulfid-Anions nachgewiesen werden. In der nachstehenden HRMS-Auswertung sind die einzelnen Hydrolyseprodukte dargestellt (Abb. 24).

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	2.5 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	2800 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	6.0 l/min
Scan End	850 m/z	Set Collision Cell RF	200.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

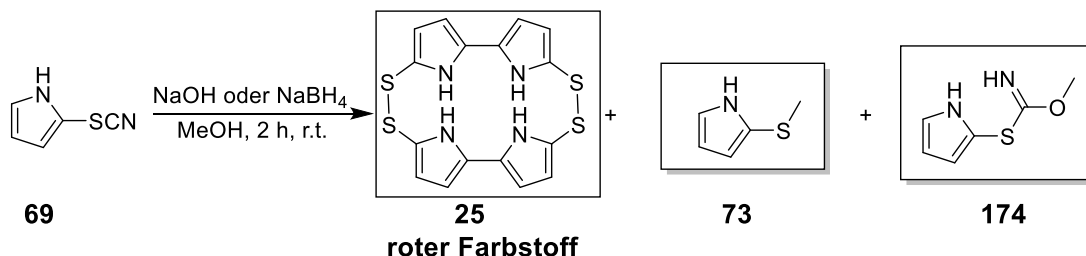


Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e ⁻ Conf	N-Rule
114.9681	1	C4H3S2	114.9682	0.8	3.1	1	100.00	3.5	even	ok
146.9574	1	C4H3O2S2	146.9580	3.9	3.0	1	100.00	3.5	even	ok
162.9519	1	C4H3O3S2	162.9529	5.9	48.7	1	100.00	3.5	even	ok
178.9291	1	C4H3O2S3	178.9301	5.3	2.2	1	100.00	3.5	even	ok
194.9240	1	C4H3O3S3	194.9250	4.9	64.0	1	100.00	3.5	even	ok

Abbildung 24: HRMS-Auswertung der Hydrolyseprodukte von Thienyldisulfid.

4.1.1 Syntheseroute zur Darstellung des roten Farbstoffs

Eine der wichtigsten Punkte der Arbeit war Entwicklung möglicher Synthesestrategien zur Darstellung des roten Farbstoffs oder seiner Analoga. Wie im vorigen Kapitel diskutiert, konnten verschiedene Reaktionstypen von organischen Thiocyanaten beobachtet werden. Bei der Umsetzung von 2-Thiocyanatopyrrol kam es zur der geplanten Reaktion, wobei sich eine rote Substanz bildete (Schema 29). Es handelte sich hierbei um das naturidentische Produkt, wobei verschiedenste Methoden zur Charakterisierung und Verifizierung der Struktur genutzt wurden. Bei der Synthese handelte es sich um eine Eintopfreaktion mit außerordentlich geringem apparativen Aufwand.



Schema 29: Syntheseroute des roten Farbstoffs.

Zum Zeitpunkt der Synthese standen jedoch noch keine Kristallstrukturen zur Verfügung, weshalb die Identität der Verbindung zunächst mittels NMR-Spektroskopie, HRMS (Abb. 25) und IR-Spektroskopie (Abb. 26) geklärt wurde. Alle genutzten Analyseverfahren zeigten hierbei, dass sich um dieselbe Verbindung handeln musste. Die daraufhin entwickelte Kristallisation und Bestimmung der Kristallstruktur bestätigten diese Annahme. Da jedoch noch nicht endgültig geklärt war ob es sich um ein Dithiin oder eine bis-disulfidische Struktur handelt, konnte lediglich festgestellt werden, dass es sich um identische Verbindungen handelt. Bei der Betrachtung der HRMS-Ergebnisse konnte auch das zuvor für „natürlichen“ roten Farbstoff erhaltene Signal bei m/z : 386,9877 reproduziert werden wenn auch bei unterschiedlichen Massenspektrometern in unterschiedlicher Intensität. Dieser Peak wurde als $[M-H]^+$ interpretiert was sich später als korrekt herausstellen sollte.

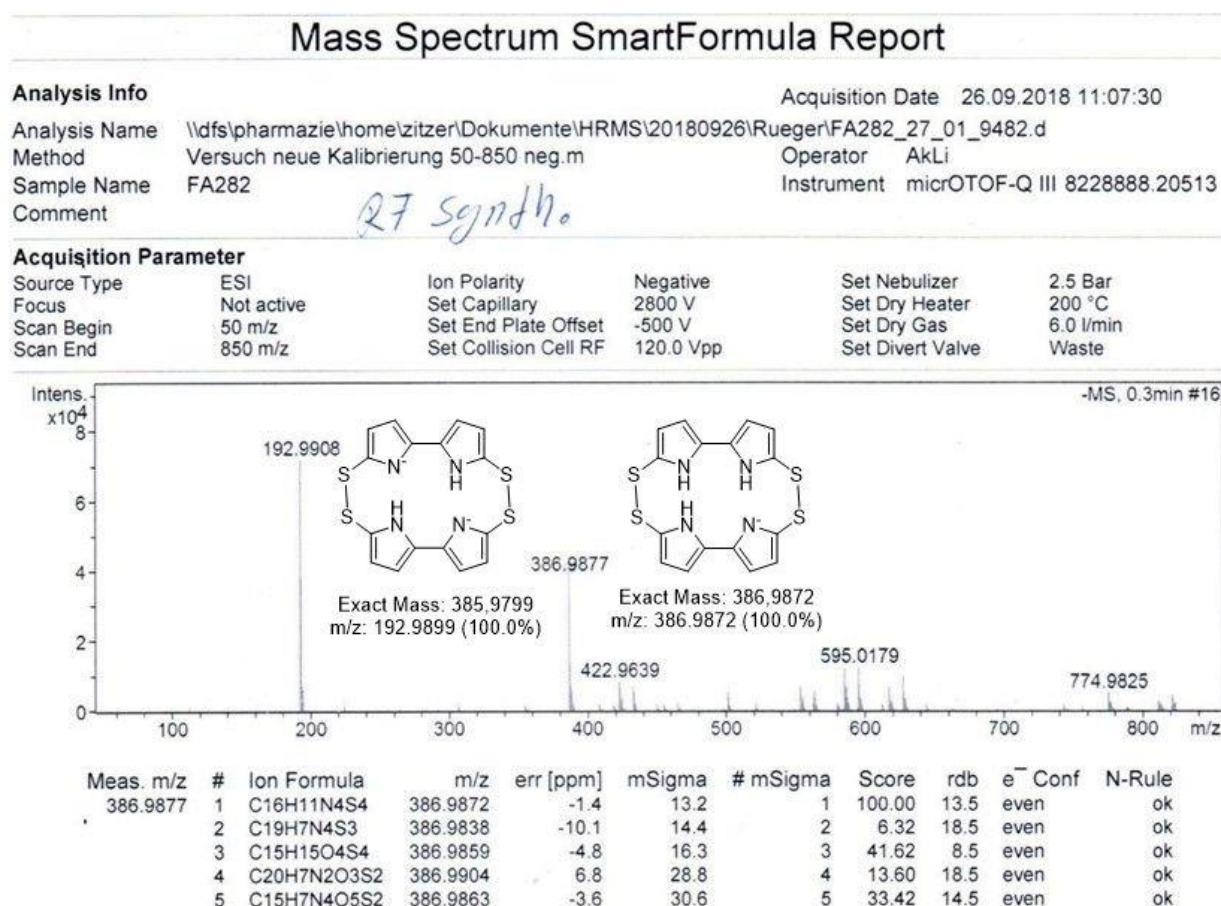


Abbildung 25: HRMS-Spektrum von synthetisch hergestelltem roten Farbstoff.

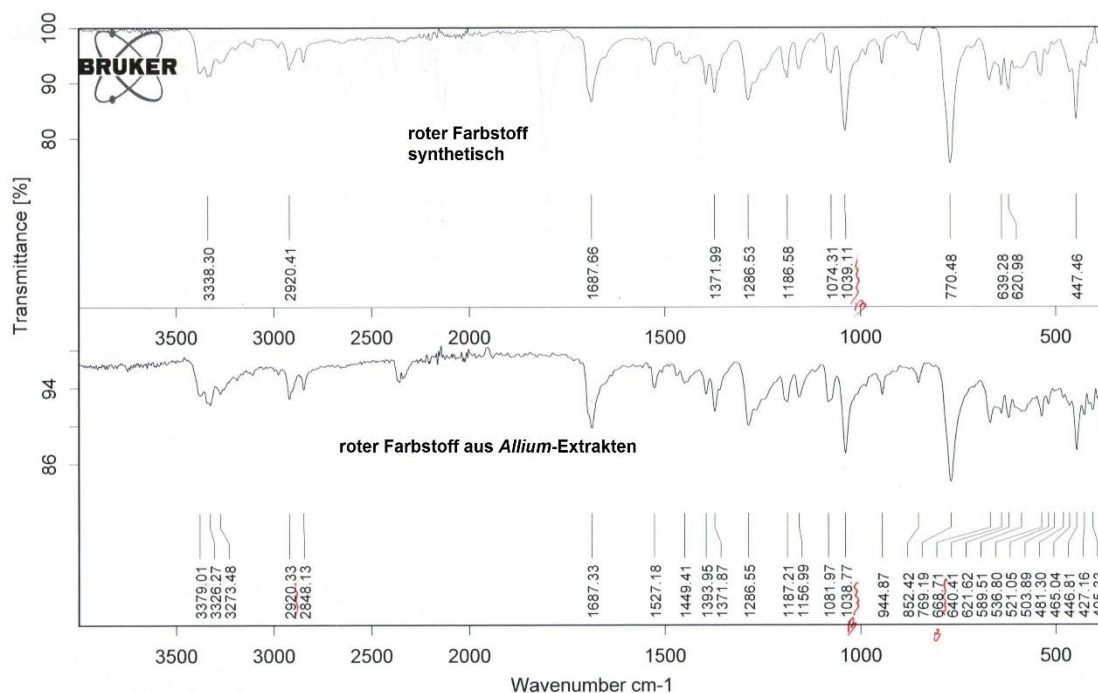


Abbildung 26: Vergleich der FTIR-Spektren von synthetischem und natürlichem rotem Farbstoff.

Der rote Farbstoff konnte erfolgreich in verschiedenen Lösungsmitteln dargestellt werden, jedoch zeigte sich bei der Verwendung von primären Alkoholen (Ethanol und Methanol) die zuvor beschriebenen Nebenreaktionen wie die Bildung Thioethern (z.B. **73**) und Carbonimidothioaten (z.B. **174**). Da diese Nebenreaktionen jedoch von wissenschaftlichem Interesse waren wurden Methanol sowie Ethanol weiter für die Darstellung der Substanz verwendet. Andere Syntheserouten, ausgehend von Pyrrol und Schwefel oder Bipyrrrol und Schwefel in DMF bei ca. 140 °C lieferten ausschließlich polymere Produkte. Analoga ließen sich aus N-substituierten 2-Thiocyanatopyrrolen nicht darstellen, es zeigte sich zwar eine rege Farbveränderung der Reaktionsansätze über die Dauer der jeweiligen Reaktionen, jedoch gelang es in keinem Fall ein Bisdisulfid zu isolieren.

Eine Darstellung des 2-Pyrrolylcysteinsulfoxid, welches der Pflanze als Ausgangsstoff für die Generierung des roten Farbstoffs dient, war nicht Bestandteil der Arbeit; wurde jedoch wurden im Verlaufe der Promotion verstärkt Hinweise auf eine mögliche Synthese gefunden. So lassen sich die Thiocyanate durch Reduktion in die jeweiligen Thiole oder Thiolate überführen, welche durch Umsetzung mit 3-Chloralanin und anschließender Oxidation die gewünschten Produkte liefern sollten. Auch eine Umlagerung dieser Produkte ist nach Carmona *et al.* möglich.^[135]

4.2 Extraktion von schwefelhaltigen Pyrrolverbindungen aus *Allium*-Proben

Die Extraktion des Thiaporphyrins aus Pflanzenproben zeigte, dass sich wohl ein nicht unerheblicher Anteil der Verbindung mit dem fein verteilten Zellmaterial assoziiert bzw. an dieses gebunden vorliegt. Auch in weiteren Schritten, bei denen das Ziel die Purifikation des bis dato nicht korrekt beschriebenen Pyrrol-lactylsulfoxids war, zeigte der rote Farbstoff eine hohe Affinität zu polymeren Matrices und ein großer Teil der Verbindung verblieb auf der Ionentauschersäule. Auch im Durchlauf zeigte sich eine Assoziation mit ausfallenden Polysacchariden bzw. anderen hochmolekularen Verbindungen oder anderen polymeren bzw. hochmolekularen Verbindungen nach Reduktion des Methanolgehaltes (Abb. 27).

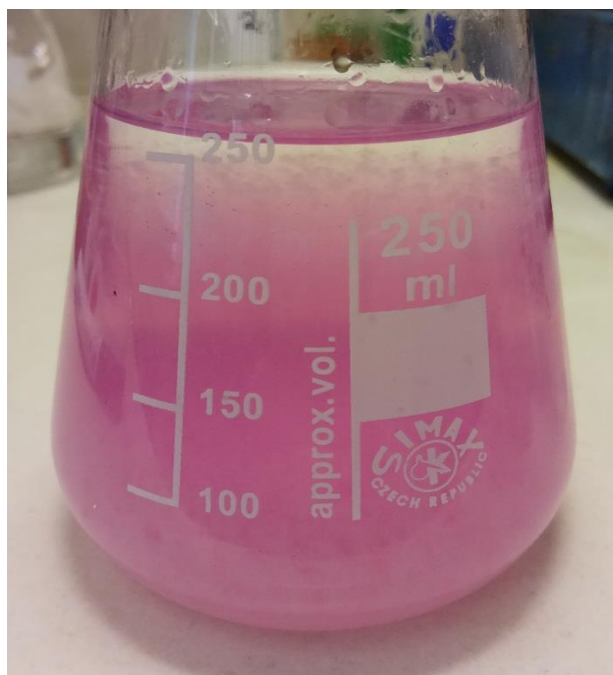


Abbildung 27: Assoziation: Tetrathiaporphyrin mit polymeren Verbindungen eines *Allium*-Extraktes.

Nach zirka 5 Stunden war der Niederschlag leicht gelblich gefärbt und die Rotfärbung des Niederschlages war vollständig verschwunden. Dies ist auf die Oxidation des labilen Thiaporphyrins zurückzuführen. Wie bei Experimenten mittels SPR verifiziert werden konnte, kommt es bei der Exposition mit Oxidationsmitteln, wie Luft oder verschiedenen Metallionen, zur Polymerisation. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die ver-

schiedenen *Allium*-Spezies deutlich unterschiedliche Ausbeuten an rotem Farbstoff liefern. Es zeigte sich, dass *Allium macleanii* eine deutlich höhere Ausbeute liefert, als z. B. *A. rosenorum* (Tabelle 50 und 51).

Tabelle 50: Übersicht der durchschnittlichen Methanolextrakt-Massen verschiedener *Allium*-Spezies.

Spezies	Tax.	Extrakt (MeOH) [mg] pro 20,0 g <i>Allium</i> -Lyophilisat
<i>A. macleanii</i>	5455	689,5
<i>A. jesdianum</i>	6508	1020,0
<i>A. rosenorum</i>	2266	912,5

Tabelle 51: Übersicht der Ausbeuten von rotem Farbstoff verschiedener *Allium*-Spezies.

Spezies	Tax.	Ausbeute [mg] pro g Lyophilisat
<i>A. macleanii</i>	5455	0,8
<i>A. macleanii</i>	6555	1,1
<i>A. jesdianum</i>	6508	0,7
<i>A. rosenorum</i>	5137	0,3

Generell konnten bei den Spezies *Allium macleanii*, *Allium giganteum* sowie *Allium jesdianum* höhere Ausbeuten an roten Farbstoff bzw. farbigen Fraktionen als bei *Allium rosenorum* erhalten werden. Jedoch schwankte auch innerhalb einer Spezies der Wert stark. Die Werte für die gelbe Farbstofffraktion wurden nicht tabelliert, da diese nur sporadisch in Proben gefunden wurden. Es wurden in Proben, die diese Verbindung enthielten, maximal 0,2 mg pro 20,0 g lyophilisiertem Material erhalten.

4.3 Analytik von Organoschwefelverbindungen aus *Allium*-Spezies

Der Hauptschwerpunkt der Arbeit lag im Bereich der Klärung der Struktur des roten Farbstoffs, womit der Extraktion der Proben ein sehr hoher Stellenwert zufiel. Aufgrund der nur in geringen Mengen enthaltenen bzw. gebildeten Organoschwefelverbindungen, die in dieser Arbeit untersucht worden sind, wurde versucht, sowohl die Extraktion als auch die Aufarbeitung der Extrakte so effizient wie möglich zu gestalten.

Durch die modifizierte Extraktion und Aufarbeitung von Extrakten aus *Allium*-Proben konnte deutlich effizienter gearbeitet werden, da die frischen Proben, mittels Mörser oder Zerkleinerer, nicht bei jeder Umsetzung einzeln aufgeschlossen werden mussten. Durch die Lyophilisierung der Proben fallen Schwankungen der CSO-Konzentration durch Keimen und Alterung der Zwiebeln weg. Ein weiterer Vorteil besteht in der wesentlich längeren Haltbarkeit und der Schimmelunempfindlichkeit des Probenmaterials. Auffällig war, dass der Gehalt der roten Verbindung bei den von Prof. Dr. Keusgen wild gesammelten Proben von *Allium giganteum* mit Abstand am höchsten war und auch die im IPK Gatersleben kultivierten Proben übertrafen.

4.3.1 Lyophilisierung von *Allium* -Zwiebeln

Die für die längerfristige Lagerung gefriergetrockneten *Allium*-Proben wurden hinsichtlich ihres Wassergehaltes bzw. den Trocknungsverlust untersucht. Es zeigte sich, dass die verschiedenen Spezies auch zum Teil einige Wochen nach der Ernte einen recht konstanten Wassergehalt von 62-67 % aufwiesen (Tabelle 52).

Tabelle 52: Trockenverluste ausgewählter *Allium*-Proben.

Spezies	Taxa	Trockenverlust
<i>A. rosenorum</i>	5137	65
<i>A. rosenorum</i>	2244	67 %
<i>A. jesdianum</i>	1082	62 %
<i>A. jesdianum</i>	1022	64 %
<i>A. macleanii</i>	5455	66 %
<i>A. macleanii</i>	6508	65 %
<i>A. macleanii</i>	Afgh. 13.07.2017 M. K.	69 %

Die Restfeuchte der Proben wurde bei nur wenigen Chargen kontrolliert, diese lag jedoch für alle Lyophilisate bei 3 – 4 %.

4.3.2 Alliinasereaktion von *Allium*-Lyophilisat

Bei den Umsetzungen von lyophilisiertem Pflanzenmaterial verschiedener *Allium*-Spezies konnte im Besonderen die unterschiedlich stark ausgeprägte Alliinaseaktivität verschiedener Proben beobachtet werden. Die Enzymaktivität nahm mit zunehmendem Alter der Proben leicht ab und konnte durch Zugabe von Alliinaseextrakt aus *Allium sativum* kompensiert werden. Die Abnahme der Aktivität des Enzyms hatte jedoch keinen Einfluss auf die Ausbeute an rotem Farbstoff. Es sind weitere Versuche durchgeführt worden, bei denen, statt Zugabe des Alliinaseextraktes, die Reaktionsdauer erhöht wurde und die Ansätze im Wasserbad auf ca. 35 °C erwärmt wurden. Ebenso konnte auf eine Verwendung von Phosphatpuffer, ohne Einbußen an Ausbeute des RF, verzichtet werden, weil stark phosphathaltige Extrakte die Trennleistung der Ionentauschersäule (Dowex 02) negativ zu beeinflussen schienen.

4.3.3 Kristallisation des roten Farbstoffes aus verschiedenen Lösungsmitteln und Kristallographie

Um abschließend den wissenschaftlichen Disput über die korrekte Struktur des roten Farbstoffes aus *Allium* Subg. *Melanocrommyum* zu klären, wurden Kristallisationsexperimente durchgeführt. Verschiedene Solventien wurden für die Kristallisation verwendet, jedoch waren nur sehr wenige der getesteten Lösungsmittel geeignet (Tabelle 53). In manchen Lösungsmittelgemischen trat zwar Kristallisation ein, jedoch waren die erhaltenen Kristalle von mäßiger Qualität und zeigten eingeschlossene Moleküle, die nicht eindeutig zugeordnet werden konnten.

Tabelle 53: Für die Kristallisation eingesetzte Lösungsmittel.

Lösungsmittel	Temperatur	Verhalten	Kristalleigenschaften
Tetrahydrofuran	r.t. und 4 °C	Zersetzung/ Polymerisation	-
DMSO	r.t. und 4 °C	Keine Kristallisation (NK)	-
Cyclohexan/Ethylacetat	r.t. und 4 °C	Kristalle (groß)	Unbekannte Verunreinigung
Cyclohexan	r.t. und 4 °C	Kristalle (verwachsen)	Nicht vermessen
Ethylacetat	r.t. und 4 °C	Kristalle (groß)	Gute Streueigenschaften
Isopropanol	r.t. und 4 °C	Zersetzung	-
Acetonitril	r.t. und 4 °C	Zersetzung	-
Benzol	r.t. und 4 °C	Kristalle (groß)	Nicht vermessen

Die Kristalle sind mittels der hauseigenen Quelle (Bruker X8 PROSPECTOR mit $I\mu S^{\text{TM}}$ Mikrofokusröhre und APEX II CCD-Detektor) vermessen und die primären Datensätze von Prof. Dr. Heine ausgewertet worden. Die vermessenen Kristalle zeigten alle eine plattenartige Morphologie sowie eine monokline Punktgruppe (Abb. 28).

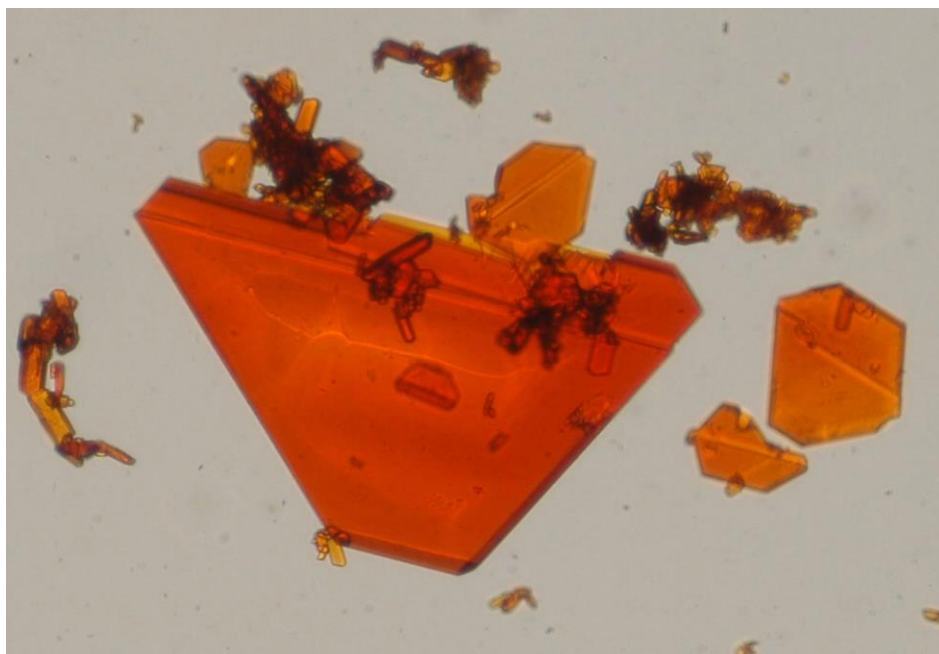


Abbildung 28: Kristalle des roten Farbstoffes unter dem Mikroskop (100x Vergrößerung).

Interessant war hierbei, dass sich, je nach verwendetem Lösungsmittel, Unterschiede in der Einheitszelle ergaben. In Lösungsmitteln mit einem Anteil an Cyclohexan war dieses auch in den erhaltenen und vermessenen Kristallen zu finden. Selbiges galt auch für Ethylacetat, aus welchem die hochwertigsten Kristalle erhalten werden konnten. Bei der Verwendung von Gemischen aus Ethylacetat und Cyclohexan waren nicht nur beide Lösungsmittel in der Kristallstruktur vertreten, sondern es zeigte sich auch, dass ein nicht zu beiden Lösungsmitteln passendes Molekül in der Struktur vertreten war, was noch am ehesten zu Benzol passt (Abb. 29). Jedoch waren weder die C-C Bindungsabstände noch die C-C Winkel in guter Übereinstimmung mit den in der Kristalldatenbank hinterlegten Angaben zu Benzol. Des Weiteren sind die Ellipsoide recht groß, was ein Indikator dafür sein könnte, dass die Elektronendichte der eigentlichen Verbindung niedriger als die von Benzol ist.

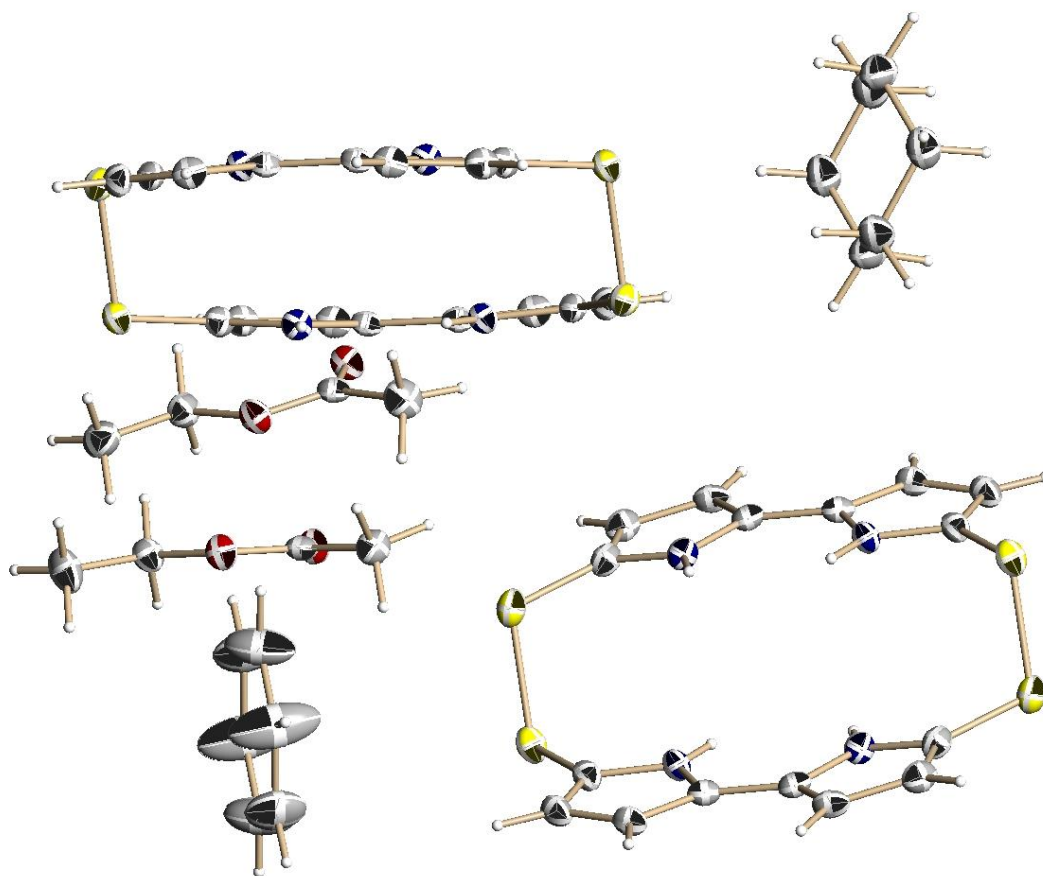


Abbildung 29: Kristallstruktur des roten Farbstoffes mit enthaltenem Ethylacetat, Cyclohexan sowie einer unbekannten Verbindung (evtl. Benzol, unten links).

Nach einer Reihe von getesteten Lösungsmitteln (Tabelle 53) zeigte sich Ethylacetat in den Bereichen Stabilität der Verbindung, Kristall-Qualität und Lösungsvermögen als die geeignetste Wahl.

Die zuletzt aus Ethylacetat als Lösungsmittel erhaltene monokline Einheitszelle enthielt zwei Moleküle des roten Farbstoffs sowie zwei Moleküle Ethylacetat (Abb. 30).

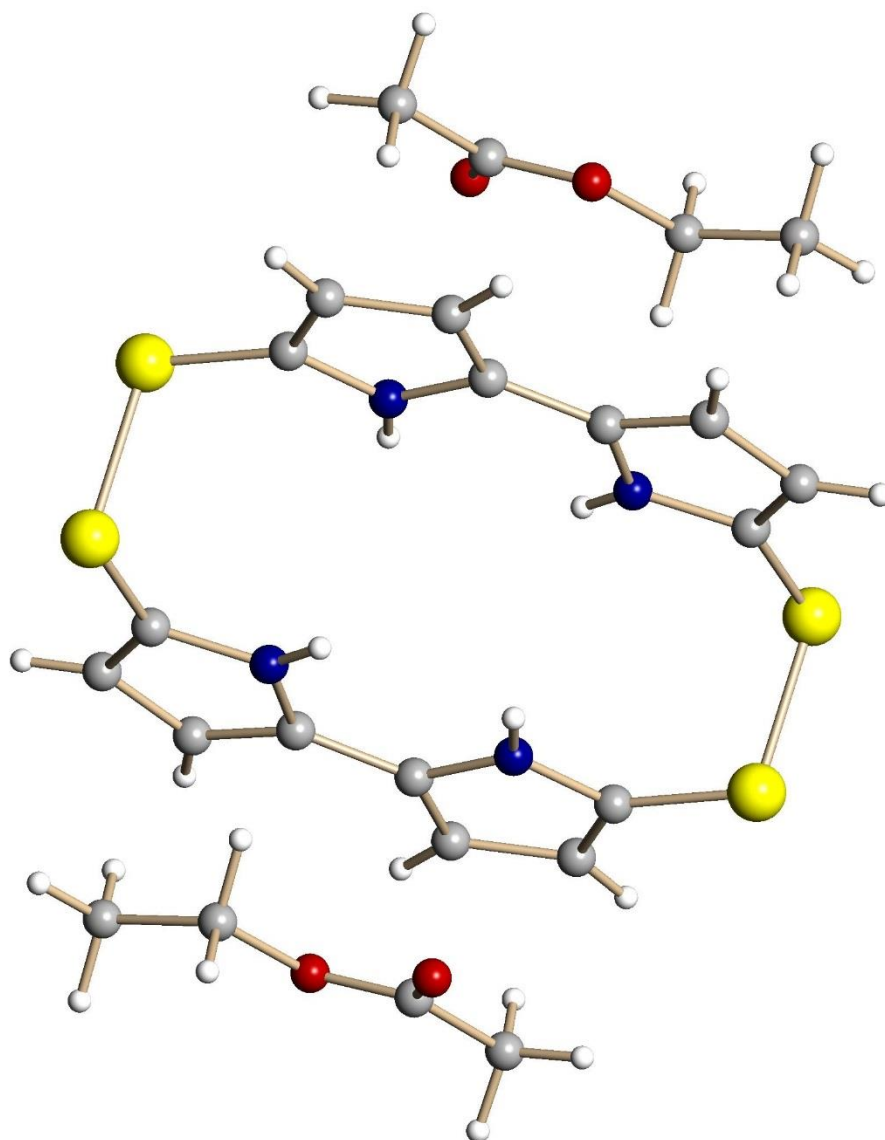


Abbildung 30: Kristallstruktur des roten Farbstoffes, kristallisiert aus Ethylacetat.

Die erhaltenen Kristalle waren bei 4 °C unter Luftausschluss mehrere Wochen in Ethylacetat stabil; jedoch zeigten sich bei der mikroskopischen Aufnahme der Kristalle unter Einfluss von Licht und Luft nach nur wenigen Min. deutliche Anzeichen der Zersetzung (Abb. 31).

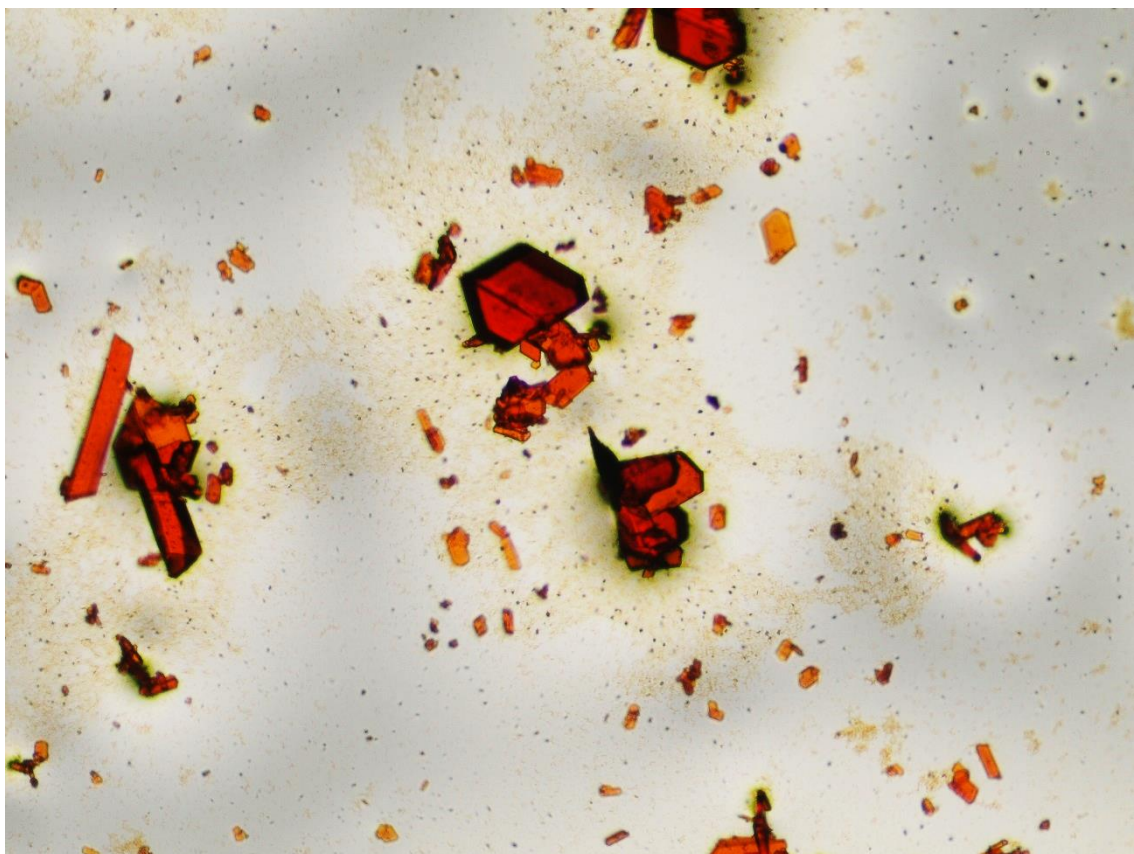


Abbildung 31: Aufnahme von Kristallen des roten Farbstoffes nach fünf Min. Exposition gegenüber Luft und Licht während der Mikroskopie (8 Watt) (100x).

Die Zersetzung ist deutlich an den sich von tiefgrün bis hin zu schwarz verfärbenden Kanten der Kristalle zu erkennen. Nach weiteren 30 Min. zeigten sich auf der Oberfläche aller Kristalle dichte schwarze, an Fell erinnernde Schichten von polymerisiertem Material. (Abb. 32). Die Polymerisation scheint in den meisten Fällen immer von den exponiertesten Stellen der Kristalle, üblicherweise den Kanten, zu beginnen und sich anschließend über die gesamte Oberfläche der Kristalle fortzusetzen. Das Polymer, das auch bei dem Versuch der Kristallisation aus THF erhalten wurde, war eine schwarze flexible Schicht, die sich am Boden des Kristallisationsbehältnisses gebildet hatte.

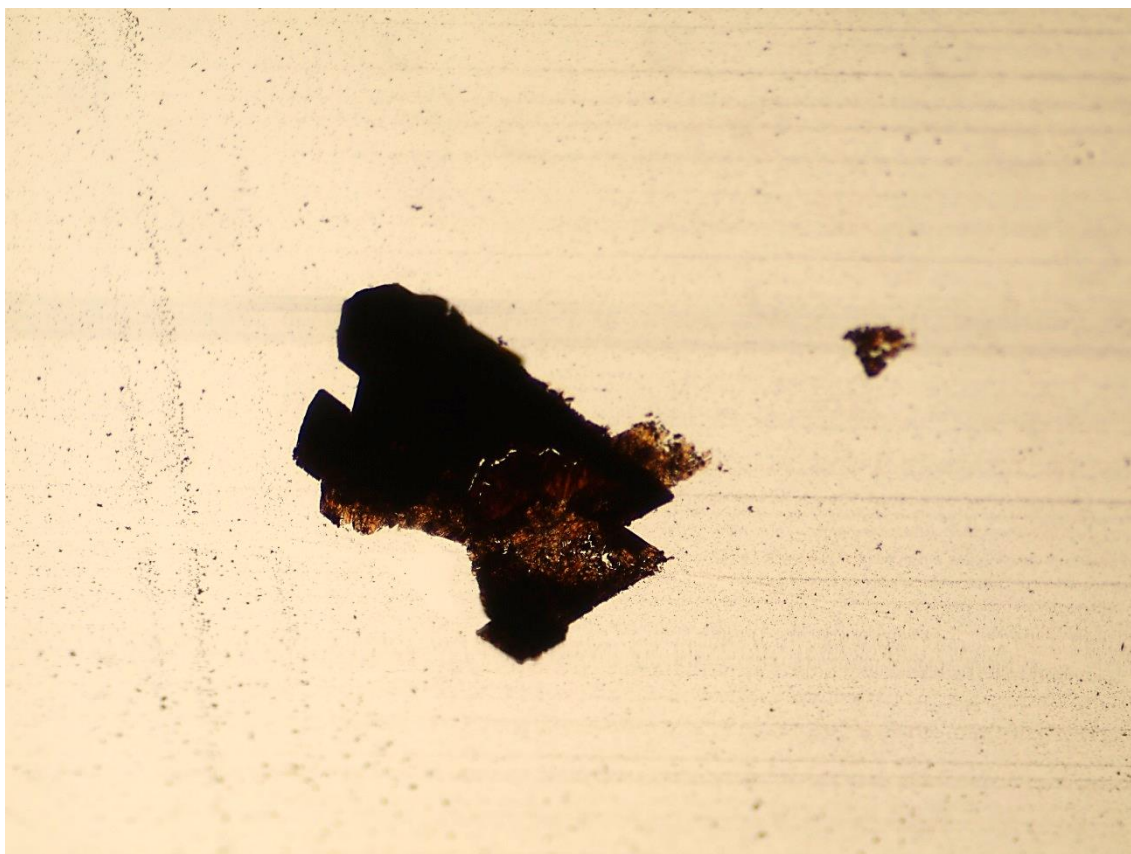


Abbildung 32: RF Kristall nach fortgeschrittener Zersetzung.

4.3.4 Derivatisierung des roten Farbstoffes mit NBS/ MeI oder IAA

Zur Brechung der Symmetrie des Moleküls wurden Versuche unternommen, den Pyrrol-Ring zu substituieren. Dazu wurden zunächst der methanolische Extrakt (10,0 mL) aus enzymatisch umgesetztem *A. macleanii* (1,0 g Zwiebel in 5,0 mL) mit 10,0 mg NBS versetzt; das Reaktionsgemisch wurde zur Lösung des NBS geschwenkt und für 4 Std. bei RT ruhen gelassen. Die nun leicht gelbliche Lösung wurde mittels DC untersucht; es zeigt sich jedoch kein Produkt-Flecken. Dieses Ergebnis spricht für eine Zersetzung, die entweder auf die Oxidation an einem der Schwefelatome und folglich einer Spaltung der S-S Bindung zurückzuführen ist, oder aber auf die Polymerisation durch den während der Reaktion potentiell freiwerdenden Bromwasserstoff.

Die Derivatisierung des RF mittels Iodmethan wurde in DMF als Lösungsmittel durchgeführt. Durch Zugabe von NaH zur Deprotonierung der Pyrrole konnte eine tiefblaue Lösung erhalten werden (Abb. 33). Es ist davon auszugehen, dass der Farbumschlag des RF von tiefrot nach violett bei Zugabe von wässriger NaOH auf die gleiche Deprotonierungsreaktion zurückzuführen ist, allerdings in geringem Maße.

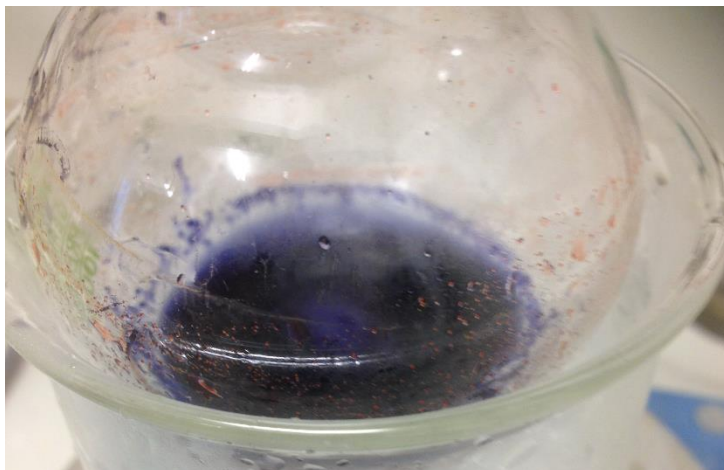


Abbildung 33: Farbveränderung des roten Farbstoffs nach Deprotonierung durch NaH in DMF.

4.3.5 HPLC, HPLC-MS sowie MSMS Analytik von *Allium*-Extrakten

Den bislang ungeklärten bzw. nicht näher charakterisierten Molpeak bzw. Basispeak bei 202 amu kam während der Promotionsarbeit große Aufmerksamkeit zu. Die schon während meiner Masterarbeit angefertigten HRMS-Spektren dienten als Basis für weitere Experimente, besonders hinsichtlich der Isolation der Verbindung des m/z 203 amu. Die Ergebnisse bestätigten damals schon, dass der rote Farbstoff zwei bzw. vier Schwefelatome enthält. Des Weiteren konnte die Masse, die zuvor im Arbeitskreis Keusgen für 2-Lactylpyrrolsulfoxid nachgewiesen worden war, verifiziert werden (Abb. 34).

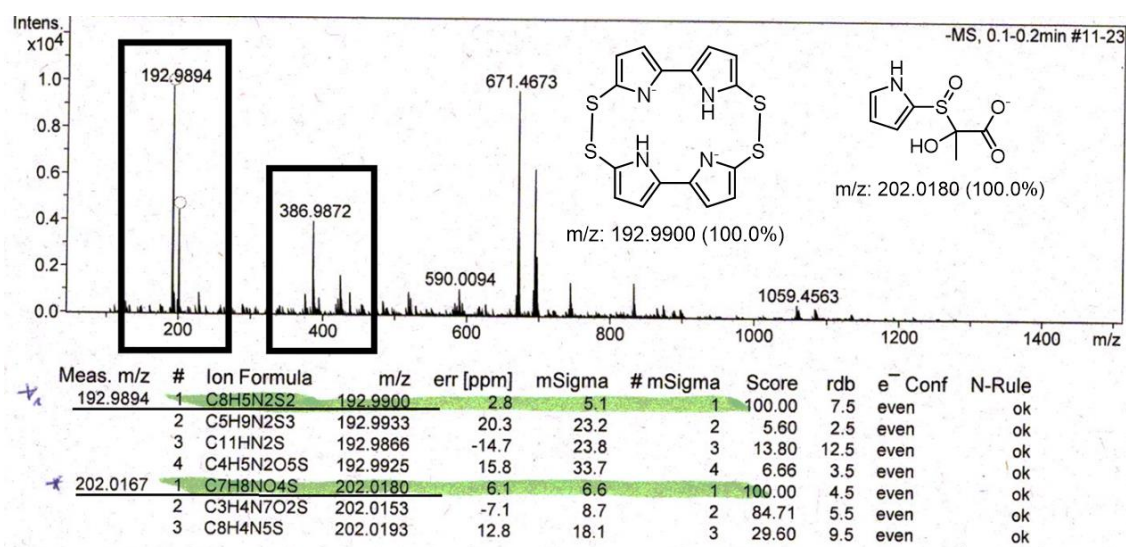


Abbildung 34: HRMS Analytik eines methanolischen *Allium giganteum*-Extraktes im negative Mode.

Auffällig ist, dass nicht nur das Anion der Summenformel $C_8H_5N_2S_2$ [m/z : 192,9894 amu] sondern auch das doppelte m/z -Verhältnis der Summenformel $C_{16}H_{10}N_4S_4$ [m/z : 386,9872 amu] auffällig gut zu erkennen sind. Diese Massen wurden dem roten Farbstoff zugeordnet und entsprechen dem einfach bzw. zweifach deprotonierten Molekül ($[M-H^+]$ und $[M-2H^+]^2$). Zu erklären wäre dies mit einer starken Wechselwirkung zwischen Ion und Molekül, z.B. durch Wasserstoffbrücken-Bildung oder der Wechselwirkung der Aromaten miteinander, potentiell durch π -Stacking. Dies setzt jedoch Aromaten voraus, die unterschiedlich elektronenreich sind. Gehen wir dabei von den postulierten Verbindungen aus, wären aufgrund der verkippten Struktur von Dithiinen π -elektronische Wechselwirkungen nur partiell möglich. Darüber hinaus wären sowohl Ion als auch die Verbindung selbst sehr elektronenreich, was diesen Erklärungsversuch zum weniger Wahrscheinlichen macht.

Die ersten Versuche, das postulierte Lactylpyrrolsulfoxid mittels PFP-Säule von anderen pyrrolhaltigen Verbindungen zu trennen, scheiterten. Es wurden im Folgenden weitere Säulentypen getestet, wobei sich die Aminophase als die geeignetste Wahl herausstellte. HPLC-MS Messungen verifizierten, dass die Verbindung der Masse 202 amu $[M-H^+]$, also das vermutete Pyrrolyl-lactylsulfoxid, effizient auf dieser Säule von anderen Verbindungen getrennt werden konnte.

Versuche, dieses Ion mittels MS/MS-Studien zu untersuchen, wurden unternommen. Hierbei wurde der positive sowie negative Mode des Massenspektrometers gewählt, um direkte Vergleiche zwischen den erhaltenen Fragmenten ziehen zu können (Abb. 35 und 36)

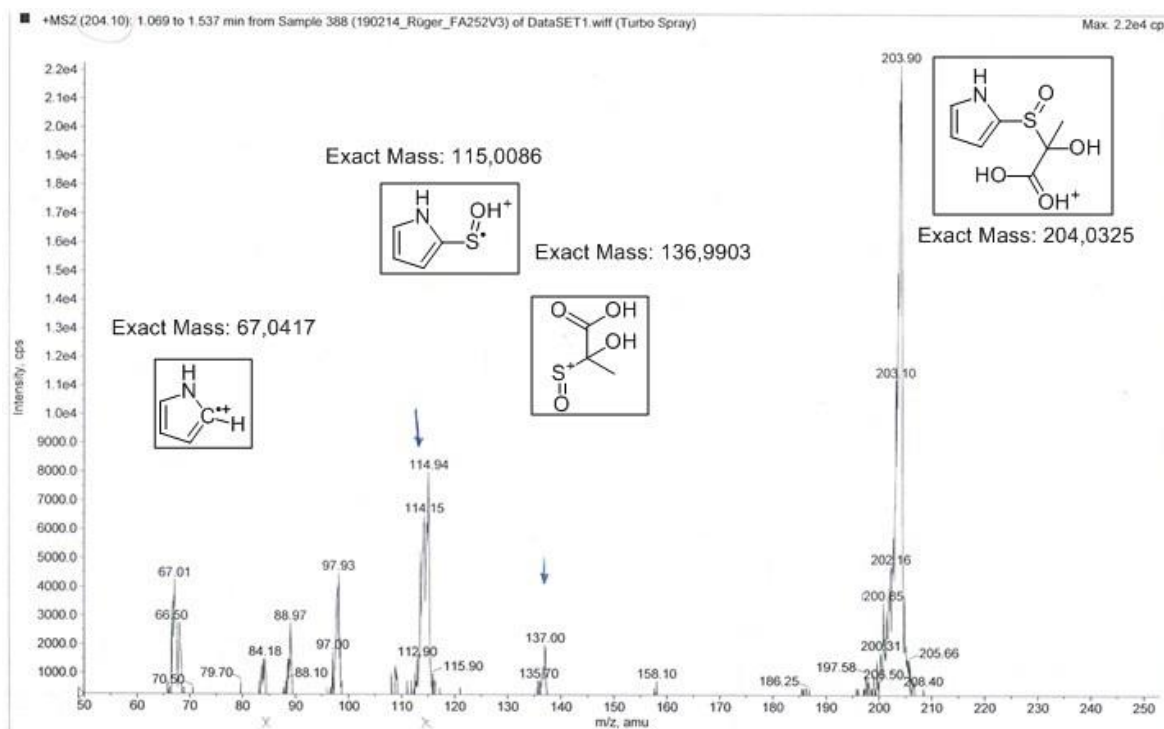


Abbildung 35: MSMS Messung des vermuteten Pyrrolyl-lactylsulfoxids im *positive Mode*.

Bei der Fragmentierung ist im Besonderen die Bildung der Pyrrolsulfon-Spezies [115,0086 amu] sowie der Lactylsulfon-Spezies [136,9903 amu] zu beachten. Weitere Hinweise auf die Korrektheit der angenommenen Struktur liefern auch das in obiger Abbildung nicht gezeigte Fragment der Masse [89,0233], welches als Hydroxypropansäurekation bezeichnet werden könnte und bei der heterolytischen Spaltung der Bindung zwischen Schwefel und „Lactylrest“ entsteht.

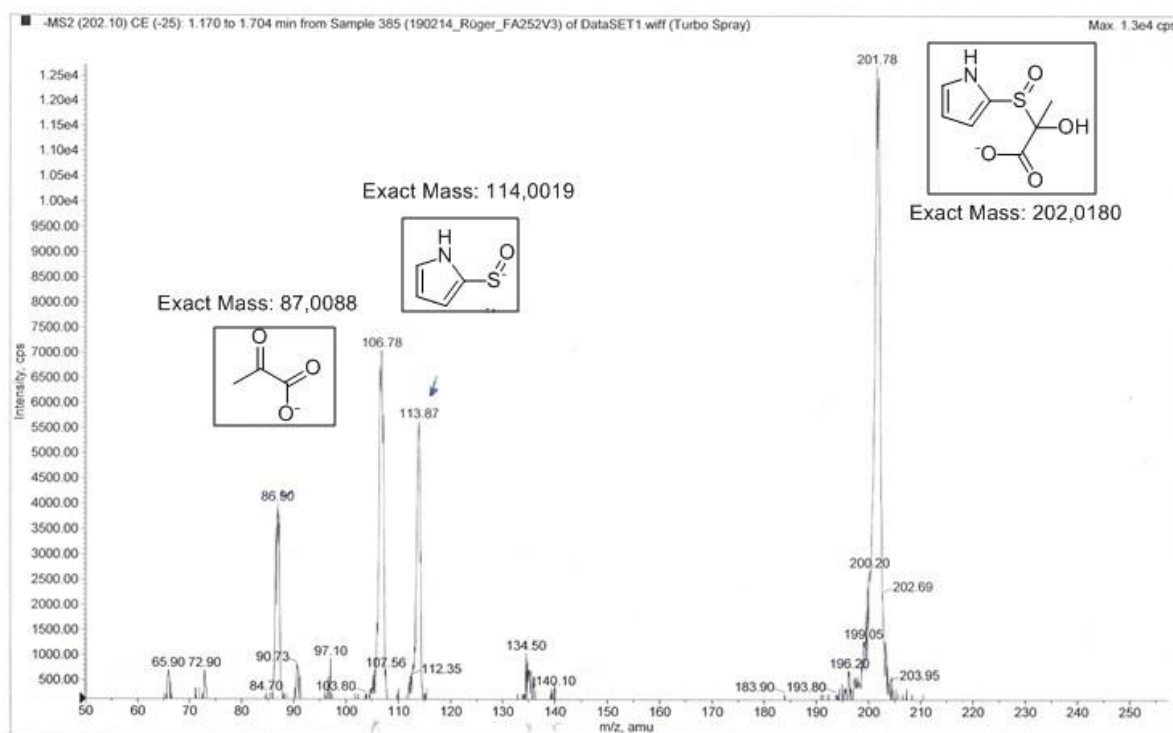


Abbildung 36: MS/MS-Messung des vermuteten Pyrrolyl-lactylsulfoxids im *negative Mode*.

Es konnte hierdurch, aufgrund der erhaltenen Fragmente, zweifelsfrei verifiziert werden, dass sowohl eine Pyrrolsulfoxid- als auch eine Lactylfunktionalität im Molekül vorhanden sein müssen.

Als wichtigste Erkenntnis der Analytik dieser Extrakte ist die Abhängigkeit der Retentionszeiten von der Ladung der Moleküle bzw. vom pH-Wert der Lösung zu nennen. Verwendet man die Extrakt-Eluat nach Ionenaustauschchromatographie direkt für HPLC- oder TLC-Analytik, so ist nur eine mäßige Trennung zu erhalten. Wird der pH-Wert des Eluats jedoch auf 7 oder höher eingestellt (1 M NaOH), so lässt sich das Gemisch mittels Aminophasen sauber trennen, ohne dabei die Trennleistung der Phase zu beeinträchtigen. Des Weiteren fielen bei den Vergleichsmessungen von stark sauren und basischen Proben auf, dass die Intensität im Basischen, für einige Peaks, deutlich abnimmt (Faktor >10) (Abb. 37). Die im Folgenden gezeigten Chromatogramme zeigen die zuvor festgestellte starke Abhängigkeit der Trennung der einzelnen Verbindungen auf Aminophasen in Abhängigkeit des pH-Wertes. Die Absorption der bei 1,6 Min. eluierenden Verbindungen scheint im schwach basischen Bereich wesentlich geringer als im sauren Milieu zu sein.

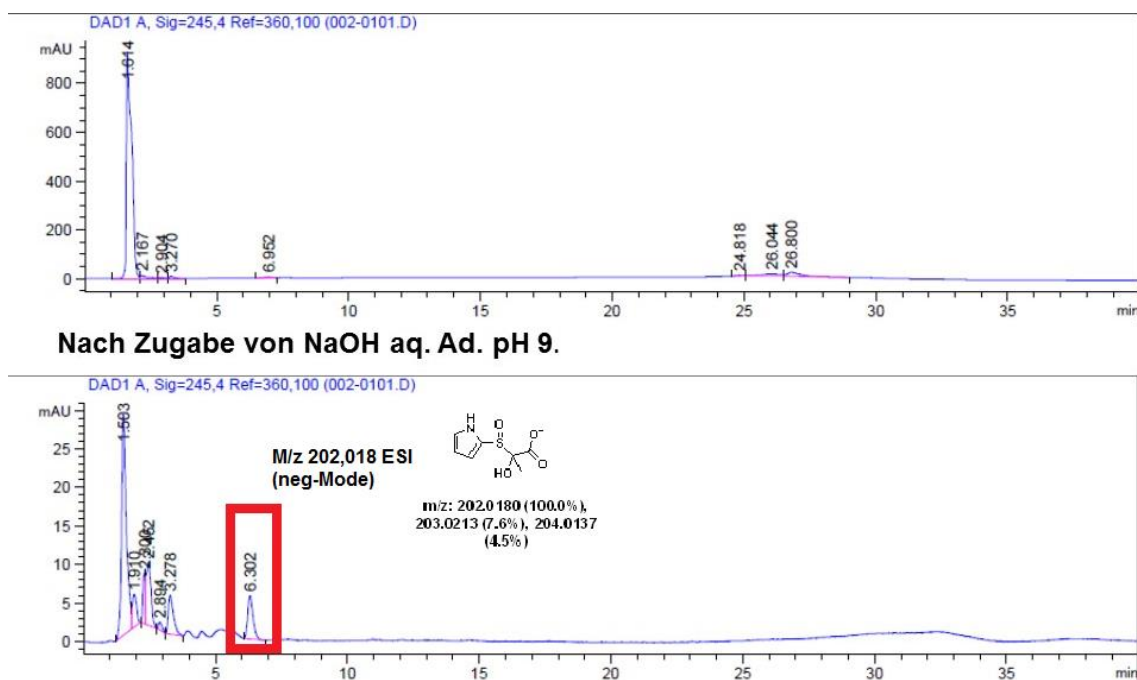


Abbildung 37: HPLC-Chromatogramme (Aminophase) eines *Allium*-Extraktes nach Ionenaustauschchromatographie vor und nach Zugabe von NaOH mit deutlicher Abnahme des Signals bei ca. 1,6 Min.

Dieses Phänomen könnte auf eine Hydrolyse oder rascher Oxidation der Verbindungen oder auf eine Veränderung / Deprotonierung des Chromophors zurückzuführen sein, welches mit einem bathochromen *Shift* der Absorptionswellenlänge der Verbindungen einhergeht.

Im Nachfolgenden ist ein HPLC-Chromatogramm (Aminophase; 250x20 mm) nach Ionenaustauschchromatographie abgebildet (Abb. 38). Zum Vergleich ist in Abbildung 39 ein analytisches HPLC-Chromatogramm eines Rohextraktes dargestellt.

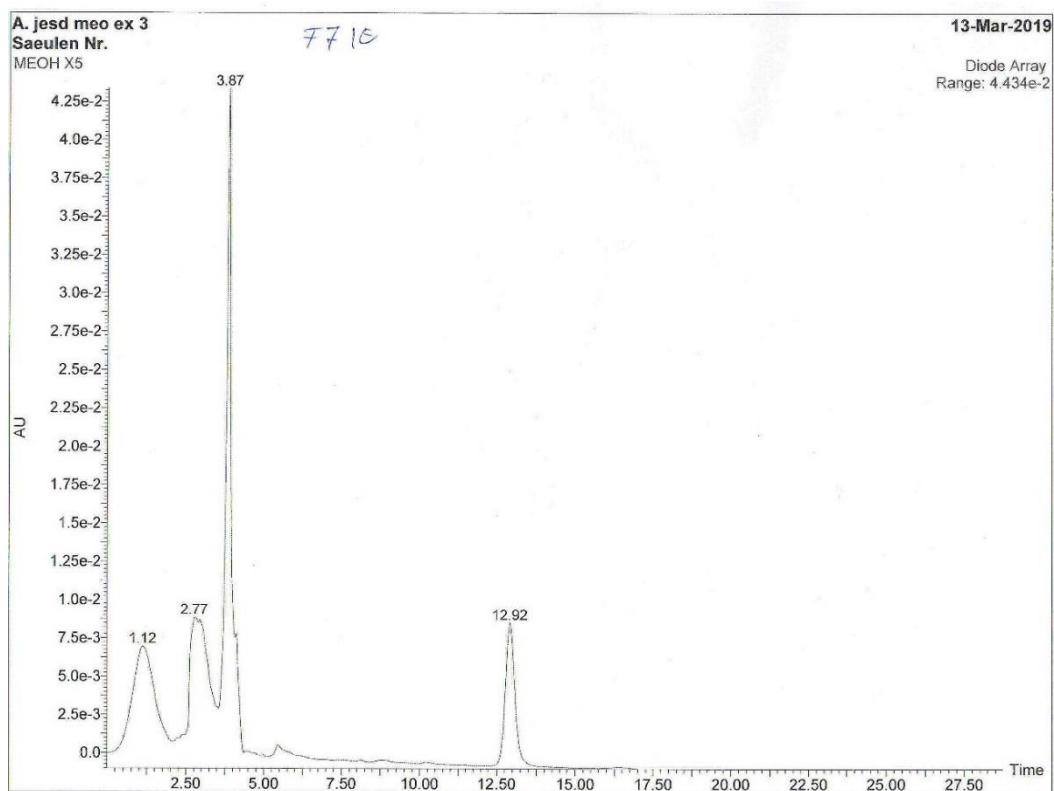


Abbildung 38: Prep. HPLC-Chromatogramm (Aminophase) eines *A. jesdianum*-Extraktes nach Ionenaustauschchromatographie.

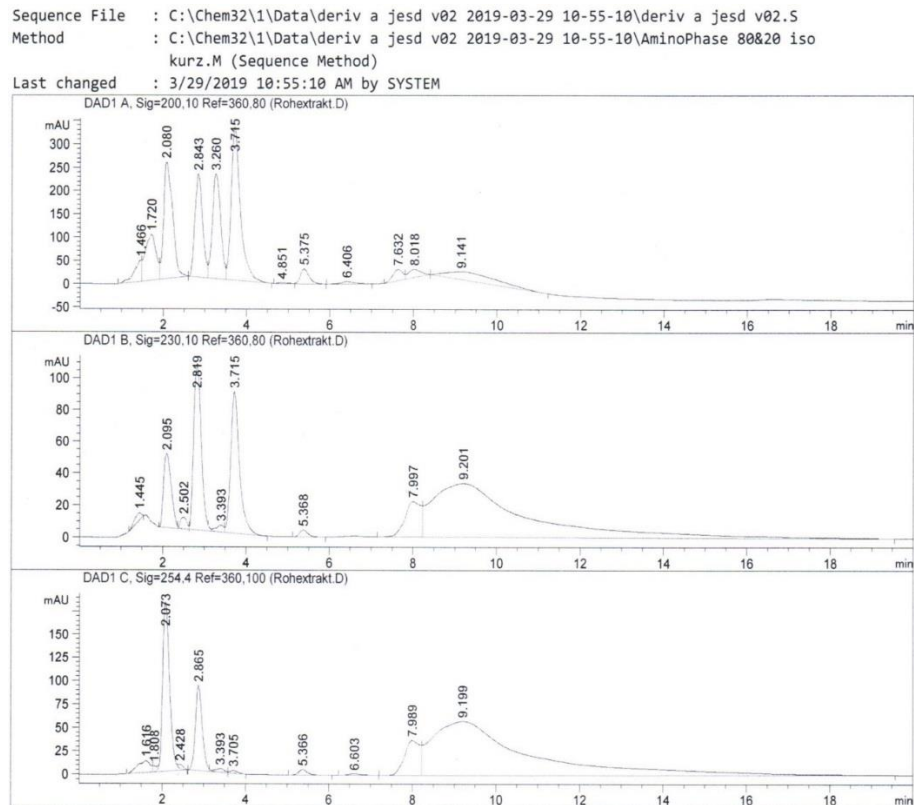


Abbildung 39: Analytisches HPLC-Chromatogramm (Aminophase) eines *A. jesdianum*-Rohextraktes; Detektion bei drei unterschiedlichen Wellenlängen (optimale Detektion der Pyrrolverbindungen um 230 nm).

Aus den Chromatogrammen geht hervor, dass sich im Rohextrakt eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen befinden. Dazu gehören vor allem auch Fructane oder andere Saccharide, welche durch Ionenaustauschchromatographie entfernt werden konnten.

4.4 Synthese von Goldnanopartikeln

Während der Arbeit wurden insgesamt drei verschiedene Methoden für die Modifikation von Goldoberflächen entwickelt. Da hierbei auch Goldnanopartikel (AuNP) eingesetzt wurden und eine Vielzahl an Tests nötig waren, erschien es sinnvoll, die verschiedenen Chargen selbst herzustellen. Bei beiden Methoden (Turkevich sowie invers Turkevich) mussten die verwendeten Glasgeräte zuvor immer mit Königswasser gereinigt werden, da sonst Agglomeration der Nanopartikel auftrat bzw. nicht die gewünschte Größenverteilung erreicht werden konnte, was zumeist schon rein optisch zu erkennen war (Abb. 41). Die hergestellten Nanopartikel zeigten eine hohe Qualität und waren weder optisch noch, was ihre Stabilität und Reaktivität betrifft, von einer gekauften Charge (Sigma-Aldrich 20 nm) zu unterscheiden.

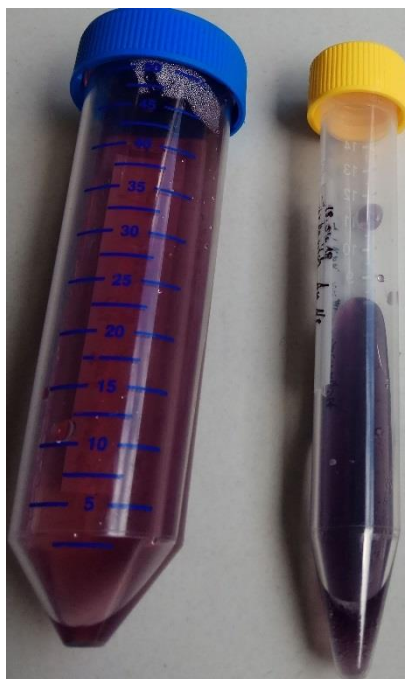


Abbildung 40: AuNP: Erfolgreich synthetisierte Charge (links); durch nicht ganz saubere Glasgeräte agglomerierende Au-NP (rechts).

Die Nanopartikel wurden mittels Absorptionsmaximum und dem daraus resultierenden Durchmesser über die Abschätzung nach Haiss *et al.* mittels der folgenden Gleichungen charakterisiert^[133]:

$$d = \frac{\ln\left(\frac{\lambda_{spr} - \lambda_0}{L_1}\right)}{L_2}$$

$$d = \exp\left(B_1 \frac{A_{spr}}{A_{450}} - B_2\right)$$

Hierbei sind d : Durchmesser, λ_{spr} : SPR Peak Position [nm]; A_{spr} : max. Absorption des SPR Peaks, A_{450} : Absorption bei 450 nm; theoretische Parameter ($\lambda_0 = 512$; $L_1 = 6,53$; $L_2 = 0,0216$) sowie ($B_1 = 3,00$; $B_2 = 2,20$).

Übersicht einiger Chargen die mit den oben genannten Methoden dargestellt wurden (Tabelle 54):

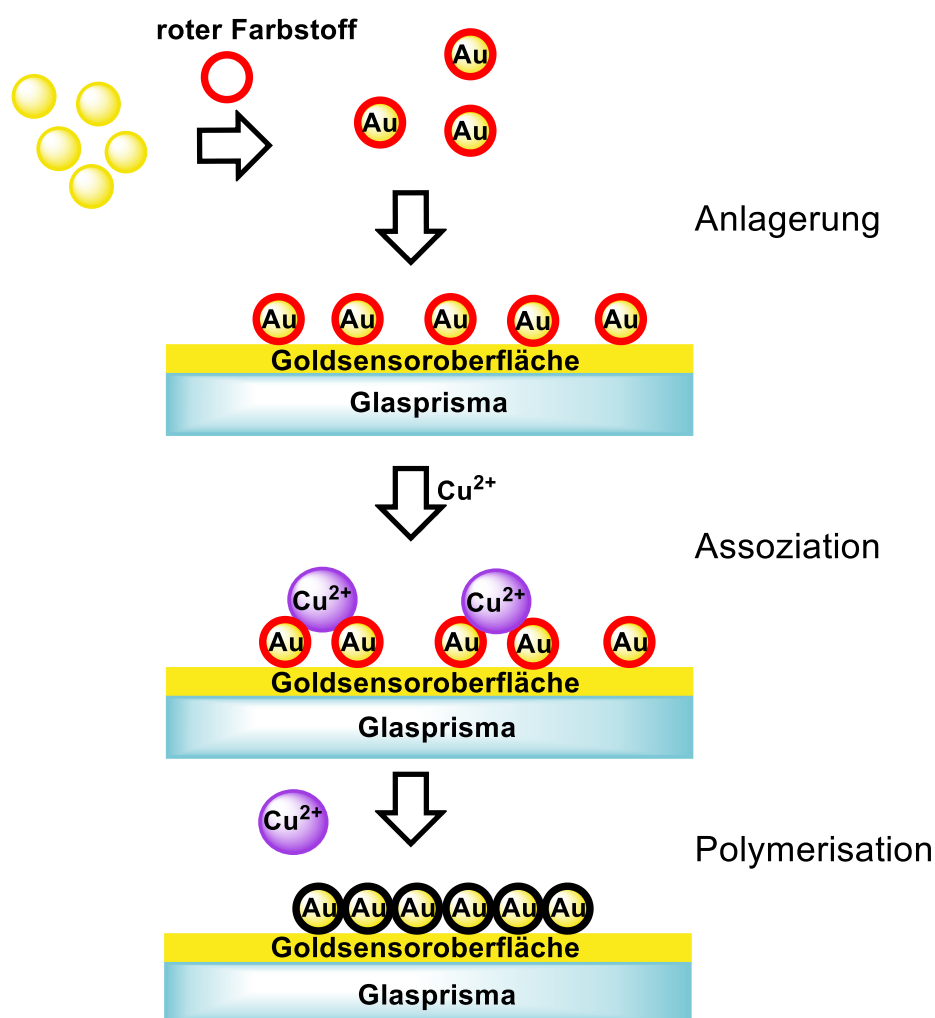
Tabelle 54: Größenbestimmung nach *Haiss et al.* für verschiedene AuNP-Chargen.

Probe	1	2	3	4	5
Methode	Invers	invers	invers	Turkevich	Turkevich
A_{450}	0,37	0,35	0,39	0,40	0,41
A_{spr}	0,56	0,55	0,63	0,69	0,71
λ_{spr} [nm]	520	517	524	526	526
d [nm]	9,8	12,3	14,1	20,1	22,5

Die so gewonnenen Nanopartikel waren über ein Jahr hinweg stabil und agglomerierten nicht in Gefäßen aus polymeren Werkstoffen (Lagerung bei 4 °C). Diese Nanopartikel wurden sowohl für die Modifikation von Antikörpern als auch für die Etablierung des in dieser Arbeit diskutierten Sandwich-Assays verwendet.

4.5 SPR-Analytik des roten Farbstoffes

Da mittels SPR-Technik nur größere Biomoleküle bzw. deren Brechungsindexänderung beobachtet werden können, der rote Farbstoff jedoch zu den „small molecules“ gezählt werden kann, wurde eine neuartige Methode entworfen, um auswertbare sowie aussagekräftige Sensogramme zu erhalten. Dies geschah durch die in einem weiteren Projekt synthetisierten Goldnanopartikel (~20 nm). Die Neuerung bestand darin, den aurophilen Charakter des roten Farbstoffes zu nutzen und die 20 nm AuNP mit diesem zu funktionalisieren. Eine schematische Darstellung des Ablaufs der Messungen ist in Schema 30 dargestellt. Diese funktionalisierten Nanopartikel (NPRP) wurden auf die Goldoberfläche des Prismas aufgebracht und zeigten ein gutes Bindungsverhalten.



Schema 30: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes zur Untersuchung des Verhaltens von NPRP bei Zugabe eines Oxidationsmittels.

Bei Zugabe eines leichten Oxidationsmittels (CuSO_4) bzw. Cu^{2+} sollte die Oxidations- bzw. Polymerisationsneigung sowie die kationenbindenden Eigenschaften der gebildeten Struktur evaluiert werden. Die wichtigste Erkenntnis der Messungen ergab, dass das vermutlich gebildete Polymer unabhängig von der Konzentration der Cu^{2+} Ionen gebildet wird. Die erreichte Brechungsindexänderung in Pixel war somit im Bereich der verwendeten Konzentrationen und Kupfersulfatlösung nahezu identisch (Abb. 41). Eine mögliche Interpretation dieses Phänomens ist, dass auf Grund der hohen Empfindlichkeit des RF die Konzentration an Kupfer wohl sekundär für eine Polymerisation ist. Die Werte nach 800 sec. Messzeit belegen, dass sich bei allen Versuchen eine ähnlich dicke Polymerschicht gebildet hat.

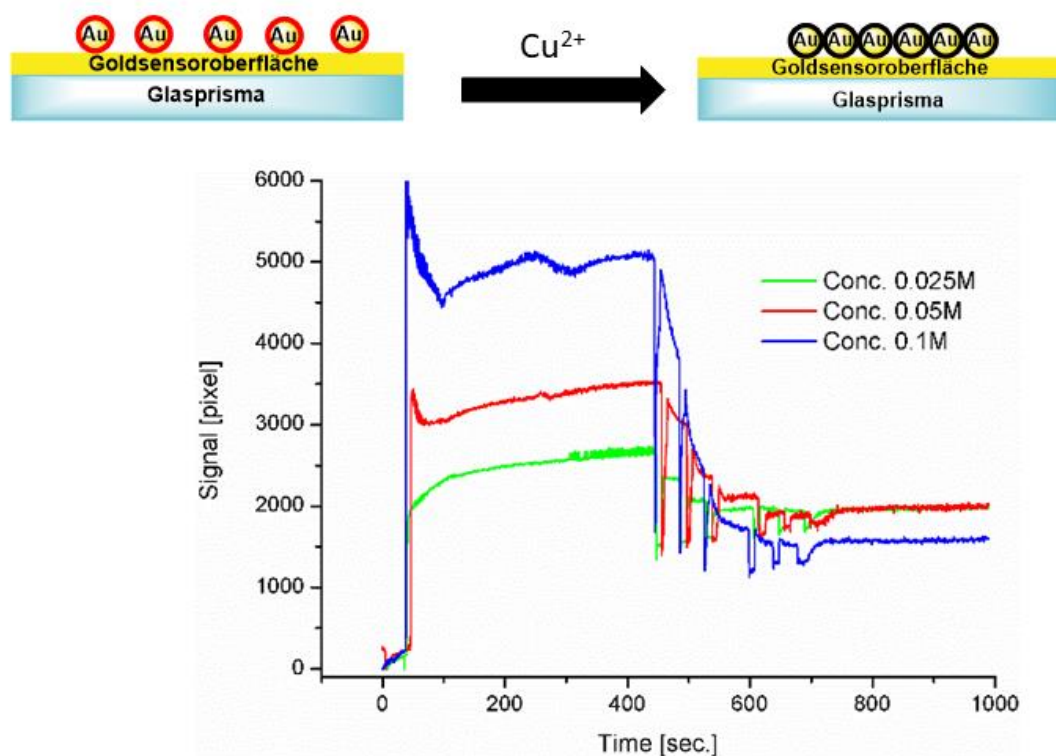


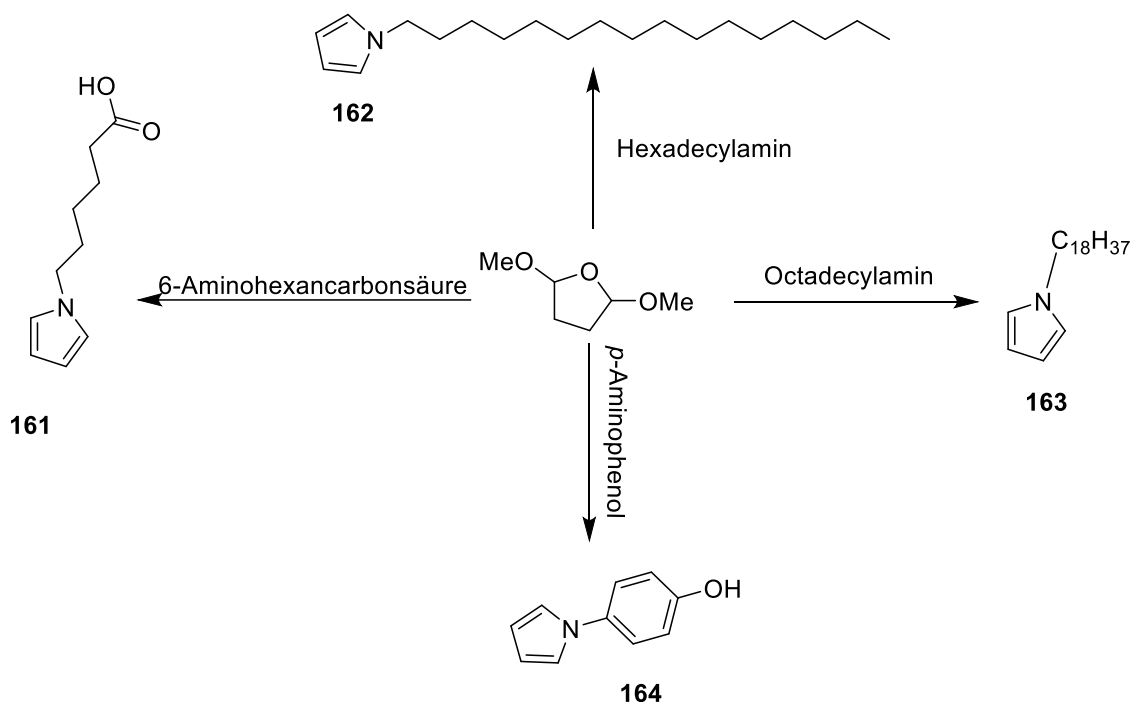
Abbildung 41: SPR Sensogramme von AuRP, die auf einer Goldsensoroberfläche immobilisiert wurden, unter Cu^{2+} Einwirkung in versch. Konzentrationen.

Der Versuchsverlauf lässt darauf schließen, dass die Polymerisation vermutlich über einen radikalischen Mechanismus abläuft und das gebildete Polymere keine hohe bzw. eine sehr geringe Affinität zu Cu^{2+} Ionen aufweist und somit eine relativ kompakte Schicht bildet.

4.6 Oberflächen-Modifikationen für die SPR-Analytik

4.6.1 Oberflächenmodifikation mittels Pyrrol-Copolymeren

Im Anschluss an die Versuche mit dem roten Farbstoff und der beobachteten, filmförmigen Polymerisation wurden beschlossen, noch weitere Pyrrole zur Funktionalisierung von SPR-Oberflächen zu synthetisieren; die Pyrrole wurden mittels einer modifizierten zwei-phasigen *Clauson-Kaas* Reaktion dargestellt (Schema 31):



Schema 31: Synthese von N-Substituierten Pyrrolen für SPR-Oberflächenmodifikation.

Die Grundidee hinter den diversen Strukturen der Pyrrole (**161-164**) war ein direkter Vergleich zwischen koordinativ modifizierten Oberflächen, wie zum Beispiel mittels Oktadecyl-1-thiol oder anderen Gold-koordinierenden Verbindungen, welche zu „Monolayern“ bzw. SAM's führen. Des Weiteren sollten zumindest zwei verschiedene Bindungsmodi erreicht werden können, zum einen über VDW-Wechselwirkungen als entropische Phänomene (N-Oktadecylpyrrol, **163**) und zum anderen über kovalente Bindung von Biomolekülen mittels EDC/NHS-Aktivierung der 6-(1*H*-Pyrrol-1-yl)hexansäure-Copolymere.

Die Reaktionen lieferten die jeweiligen Pyrrole in hohen Ausbeuten von über 90 %. Problematisch war jedoch die Handhabung der Verbindungen in Lösung, da diese relativ

schnell durch Luftsauerstoff sowie Licht zersetzt bzw. polymerisiert wurden; deshalb wurden die Verbindungen unter Stickstoff bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die erzielten Ergebnisse wurden bereits *open Access* publiziert.^[136]

Um den angedachten Assay zu etablieren, wurden die verschiedenen N-substituierten Pyrrole zusammen mit unsubstituiertem Pyrrol (**43**) (1:1) erfolgreich elektropolymerisiert. Es wurde hierbei bevorzugt mit Pyrrol/ 6-(1H-Pyrrol-1-yl)hexansäure (**161**) Copolymeren (PHCP) (Abb. 42) gearbeitet, weil sie in den ersten Tests der Oberfläche die beste Performance zeigte. Die Schichten konnten auf einigen der Goldprismen als leicht gräulicher Film wahrgenommen werden.

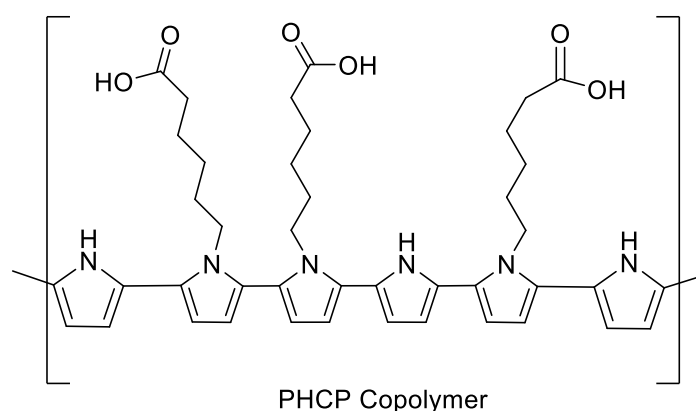


Abbildung 42: Schematische Darstellung des PHCP Copolymers.

Zunächst wurden die Wechselwirkungen dieser Oberfläche mit natürlichen Polysacchariden untersucht. In unserem Falle geschah dies mittels Mannan, welches absorptiv während der Messzyklen auf die Oberfläche aufgebracht wurde. Die Verifikation des Bindungsereignisses wurde erfolgreich durch das im Arbeitskreis *Keusgen* etablierte Fusionsprotein ConA-Sav erbracht, welches mit dem oberflächenexponierten Mannan wechselwirken bzw. an diesem durch Selbstorganisation binden sollte.^[137] Die Bindungsraten des Mannan auf dieser Oberfläche entsprachen bei den SPR-Messungen ca. 8-10 Pixeln. Jedoch konnte ConA-Sav auch nach Blockieren potentieller Vakanzen im Polymerfilm mit einer sehr hohen Affinität auf dieser Oberfläche binden (Abb. 43).

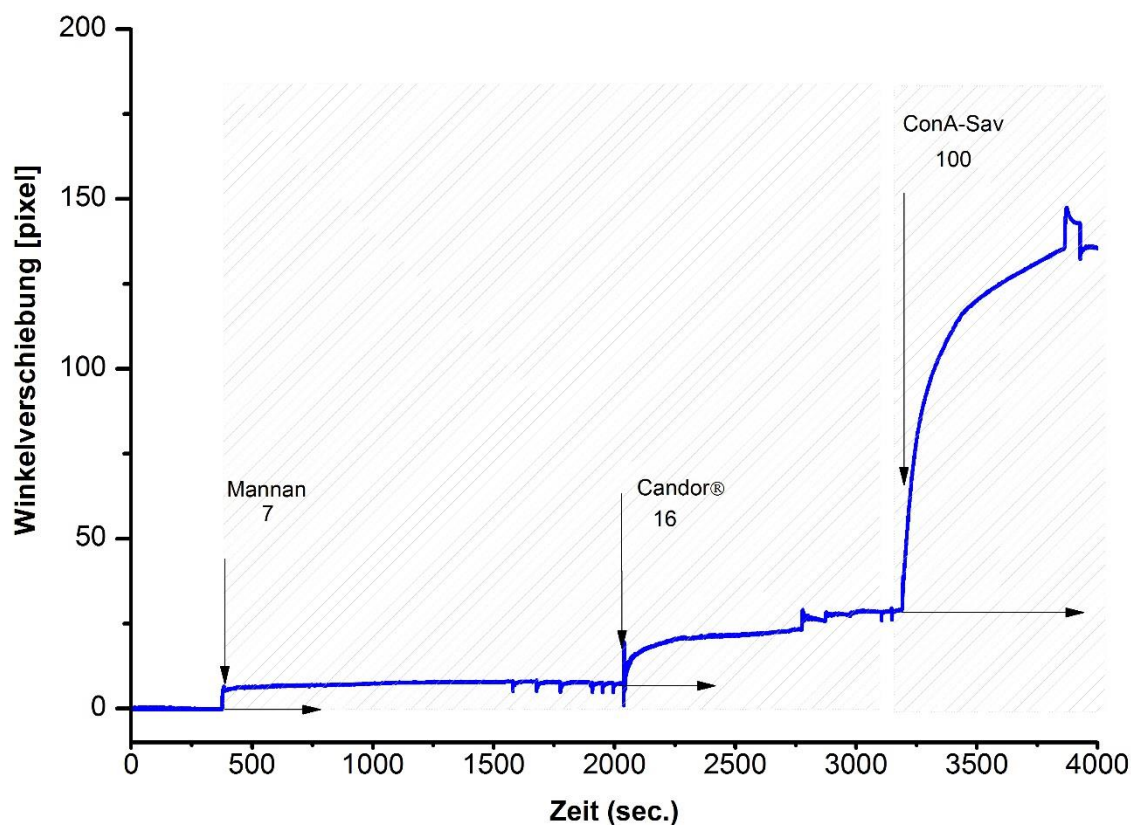


Abbildung 43: Mannan-ConA-Sav Bindungsstudien auf PHCP: 1. Zugabe Mannan (1 mg/mL); 2. Blockierung mittels Candor® (Blocking-Lösung); 3. Zugabe ConA-Sav (300 µg/mL).

Weitere Studien ergaben, dass Mannan nicht nur auf polaren Carbonsäureoberflächen, sondern auch an weitaus weniger polar modifizierten Oberflächen bindet. Es ist hierbei ein Copolymer aus Pyrrol sowie N-Hexadecylpyrrol (PC_{16}P , **162**) verwendet worden (Abb. 44).

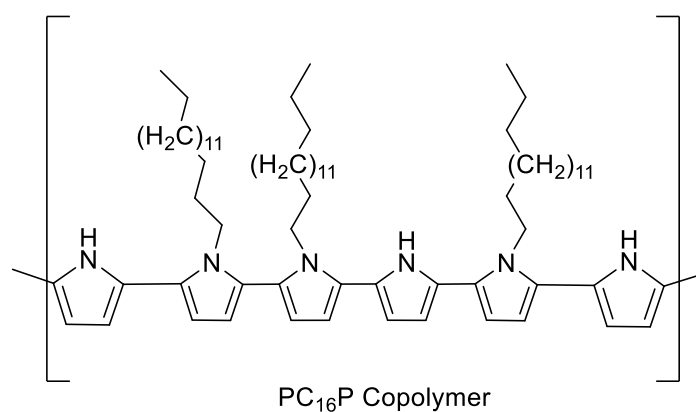


Abbildung 44: Schematische Darstellung des PC_{16}P Copolymers.

Die Bindungsrate des Mannans lag hierbei bei 22 Pixel, was ein deutlich höherer Wert, verglichen mit der Verwendung der polaren Pyrrolhexancarbonsäure, ist. Auch die sukzessive Immobilisierung des Fusionsproteins lag mit 165 Pixel, genau 65 % höher als Studien mit PHCP-Copolymer (Abb. 45).

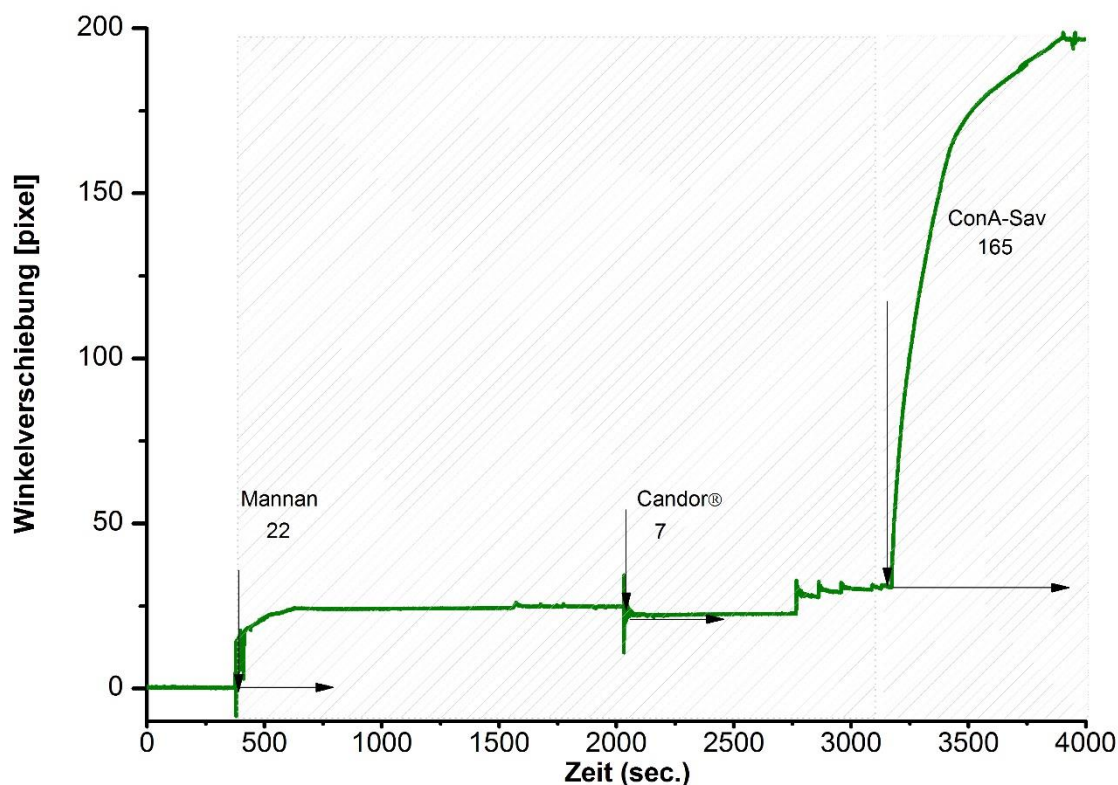


Abbildung 45: Mannan-ConA-Sav Bindungsstudien auf PC₁₆P: 1. Zugabe Mannan (1 mg/mL); 2. Blockierung mittels Candor® (Blocking-Lösung); 3. Zugabe ConA-Sav (300 µg/mL).

Weitere Versuche mit EDC/NHS-aktivierten Oberflächen verliefen ebenfalls erfolgreich, zeigten jedoch zum Teil eher niedrige Bindungsraten für Mannan. Von besonderem Interesse war die starke Bindung des Mannans an unpolare Oberflächen und die unerwartet gute Performance der resultierenden Mehrschichtoberfläche. Die Regenerierbarkeit einer solchen Oberfläche wurde durch Zugabe von Methyl α -D-Mannopyranosid-Lösung evaluiert. Dadurch sollte durch die hohe Konzentration an Methyl α -D-Mannopyranosid (10 % w/V) die Bindung zwischen ConA-Sav und Mannan durch kompetitive Verdrängung gelöst werden. Leider ergab sich nur eine mäßige, unvollständige Regenerierbarkeit (Abb. 46).

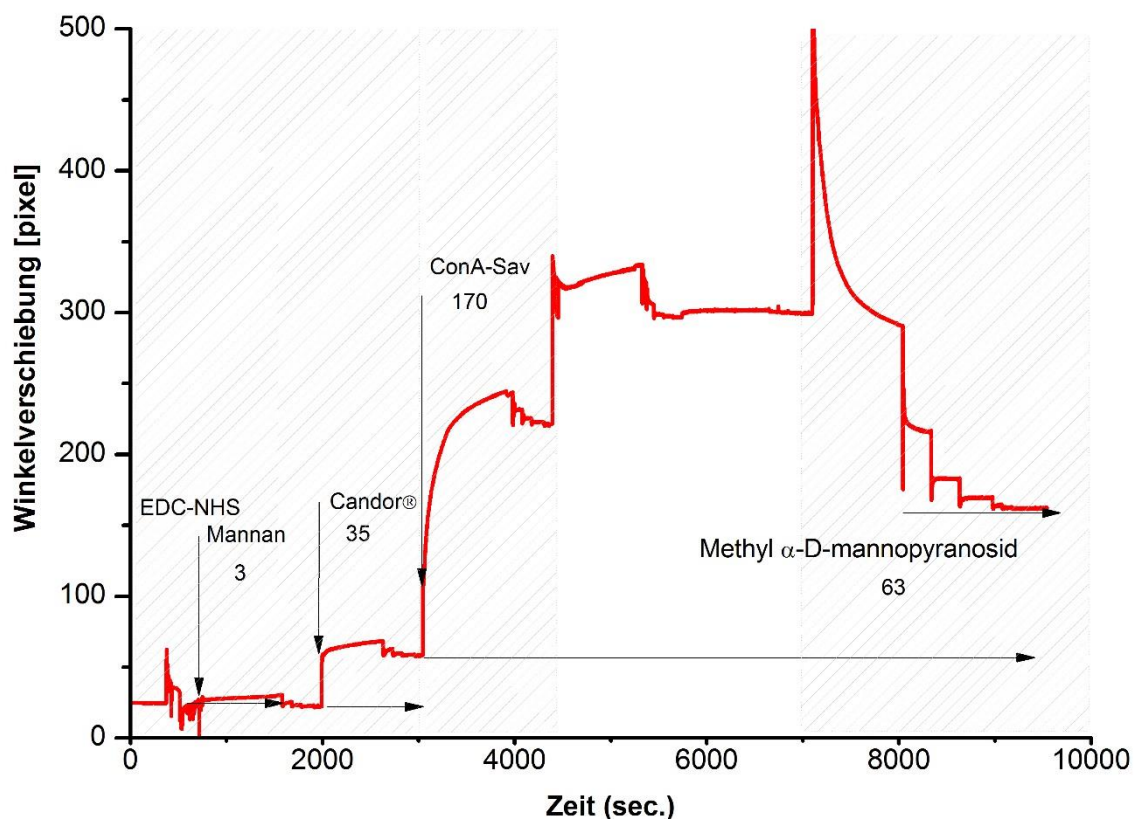


Abbildung 46: SPR Sensogramm einer PHCP EDC/NHS Mannan ConA-Sav Bindungsstudie mit anschließender Regenerierung mittels Methyls α -D-Mannopyranosid.

Es wurde für eine der Oberflächen (Pyrrol-N-C₁₆ Pyrrol Copolymer) nach verschiedenen Schritten der Bindungsstudien AFM-Aufnahmen (Dr. Jens Schäfer, Pharm. Tech. Uni Marburg) gemacht, um Wechselwirkungen von Biomolekülen im Detail analysieren zu können (Abb. 45). Es zeigte sich hierbei, dass Mannan nicht als feiner Film oder feine Schicht auf der Oberfläche vorliegt, sondern in Form von inselartigen Aggregaten. Hierbei ist beachten, dass sich auch, bei der in der Abb. 47 gezeigten Struktur der reinen Goldoberfläche kleinere Unebenheiten erkennen lassen, was auf die Beschichtungstechnologie zurückzuführen ist (Au-Sputtern).

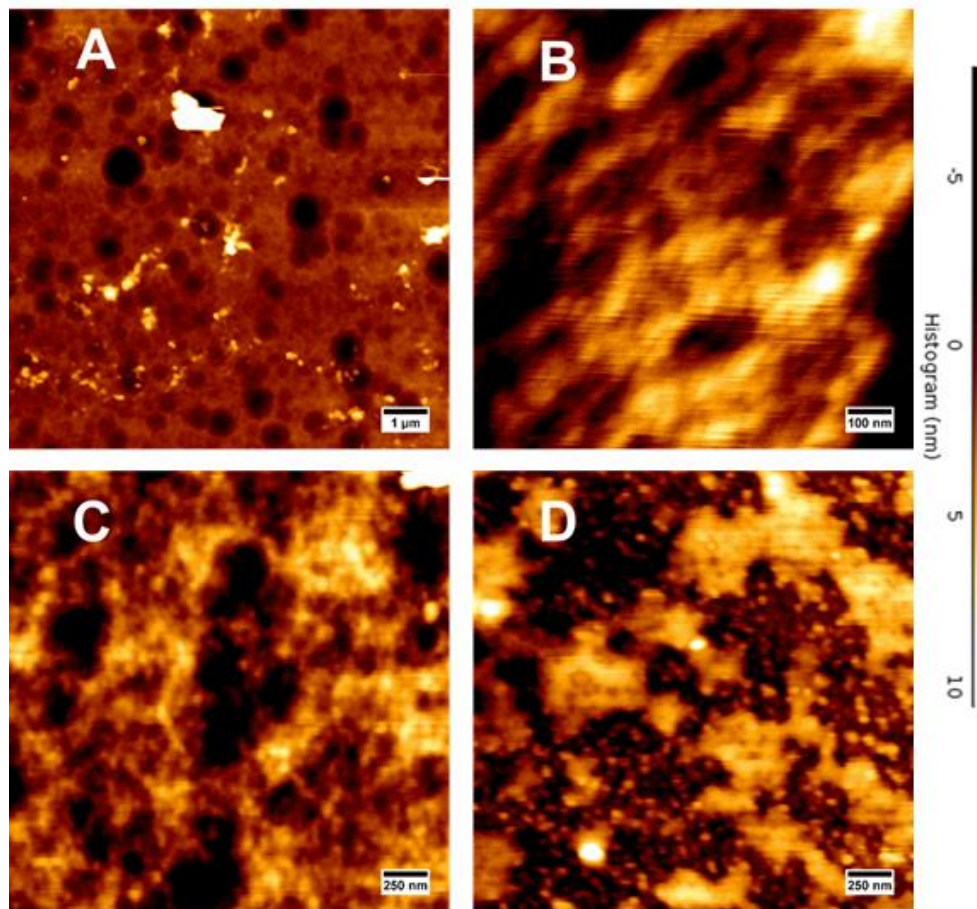


Abbildung 47: AFM Aufnahmen (HQ:NSC14AlBS) von modifizierten SPR- Chips: A) Goldoberfläche des Chips ohne Modifikation; B) Detailaufnahme der Goldoberfläche (roughness 2.56 nm); C) Mittels Pyrrol-N-C₁₆ Pyrrol Copolymer und Mannan modifizierte Oberfläche; D) Mittels Pyrrol-N-C₁₆ Pyrrol Copolymer und Mannan modifizierte Oberfläche nach Bindung von ConA-Sav (ConA-Sav Agglomerate sichtbar).

4.6.2 Oberflächenmodifikation mittels Gold -BSA-Sandwichstrukturen

Aufgrund der etwas zeitaufwändigen Vorbereitung von Pyrrol-modifizierten Chips wurde nach einer ebenso vielseitigen, jedoch experimentell schneller durchzuführenden Oberflächenmodifikation gesucht. Hierbei wurden Goldnanopartikel verwendet, die aufgrund ihrer vorteilhaften Eigenschaften, wie simple Modifikation und einfache Herstellung, ein ausgezeichnetes Volumen zu Oberflächenverhältnissen besitzen. Es wurden die natürliche elektrostatische Wechselwirkung von BSA genutzt, um Interaktionen zwischen der Goldsensoroberfläche und dem Protein zu vermitteln. Durch die Koordination des BSA, sowohl nach „oben“ als auch nach „unten“ an Gold zu koordinieren wurden diese Strukturen als Sandwichstrukturen bezeichnet (Abb. 48).

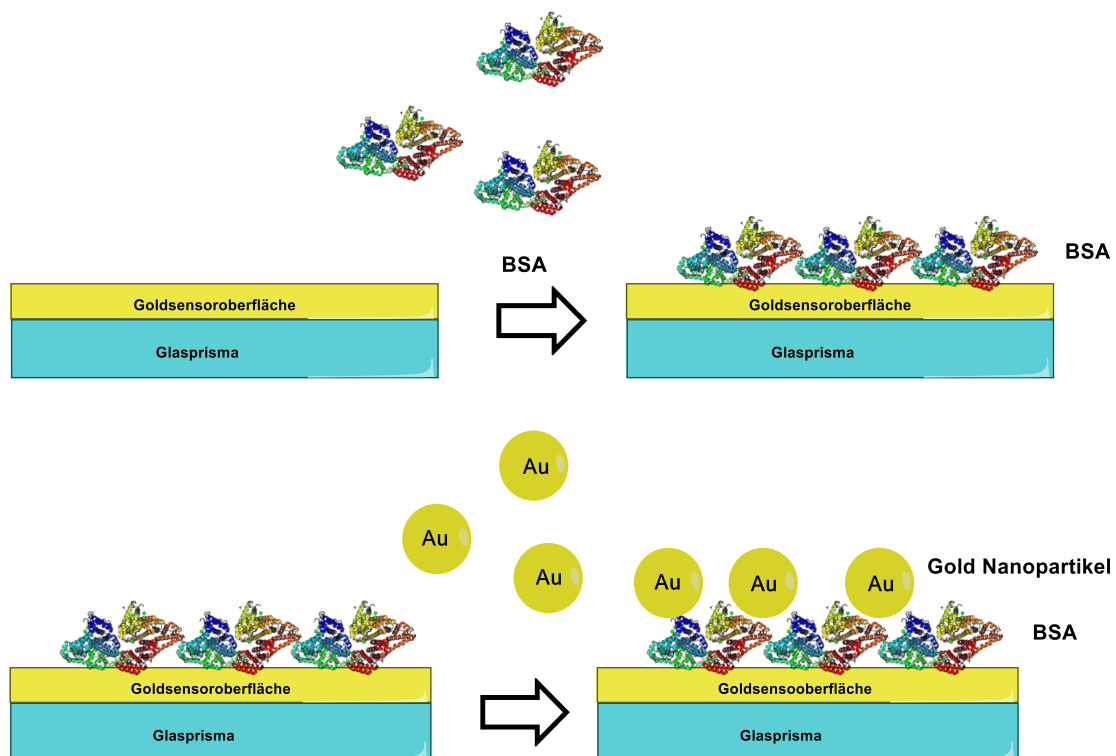


Abbildung 48: Theoretische Darstellung der Gold-BSA-Sandwich-Oberfläche.

Erste Versuche mit dieser Oberfläche zeigten nur mäßige Bindungsraten; es konnte die Wahl des Puffers als Quelle für dieses Problem ausgemacht werden. Durch die Verwendung von PBS als Puffer agglomerierte der größte Teil der BSA-gebundenen Nanopartikel. Somit wurde nach einem Puffersystem gesucht, das einen wesentlich geringeren Anionen- bzw. Kationen-Anteil aufwies und die Nanopartikel im Idealfall zusätzlich noch stabilisieren sollte, ohne die spätere Bindungsfähigkeit einzuschränken.

Es wurden Citrat-Puffer für weitere Versuche verwendet, wobei sich zeigte, dass hierbei der pH-Wert einen hohen Einfluss auf das Bindeverhalten der Oberfläche hatte. Ideale bzw. maximale Bindungsraten sind bei einem pH-Wert von ungefähr 6,4 erzielt worden. Sowohl für die Bindung des BSA an die Goldoberfläche als auch für die darauffolgende Immobilisierung der Goldnanopartikeln auf der BSA-Schicht konnten unter diesen Bedingungen die höchsten Bindungsraten erreicht werden. Es zeigte sich, dass BSA gut zur Koordination von Goldnanopartikeln geeignet war; abschließend konnte auch Streptavidin (Sav) gebunden werden (Abb. 49).

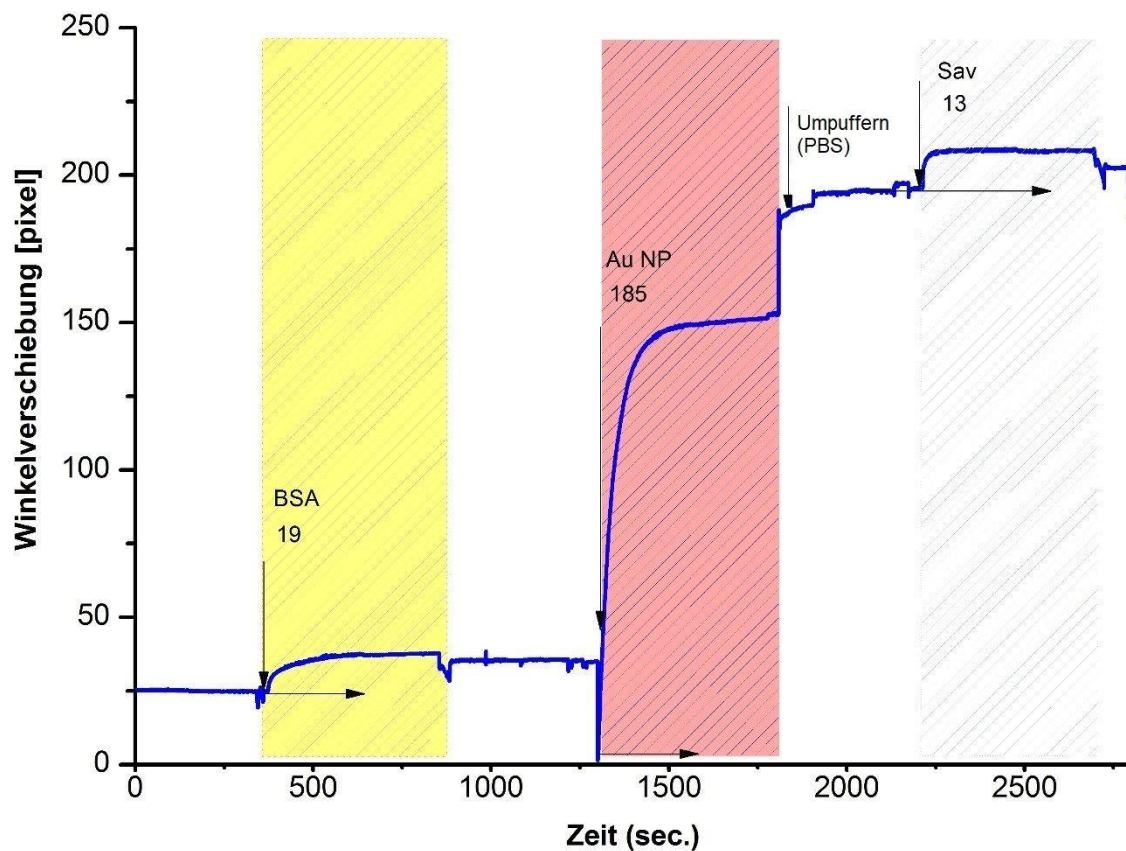


Abbildung 49: SPR Sensogramm: Bindung von AuNP auf einer BSA Oberfläche mit anschließender Immobilisierung von Sav.

Nach erfolgreicher Bindung von Sav an die Oberfläche der Nanopartikel sollte im nächsten Schritt getestet werden, ob eine zusätzliche Bindung von Sav zu biotinylierten Biomolekülen möglich ist oder ob Sav eine sterisch ungünstige Wechselwirkung mit Goldnanopartikeln im Bereich der Bindetasche eingeht und somit keine Wechselwirkung mit Biotin mehr möglich ist. Es wurde im nächsten Schritt ein biotinylierter Antikörper (Anti- α -Albumin) eingesetzt. Der Gesamt Ablauf aller Schritte der Bindungsstudien zur Verifikation der Sandwichoberfläche ist in Abb. 50 dargestellt.

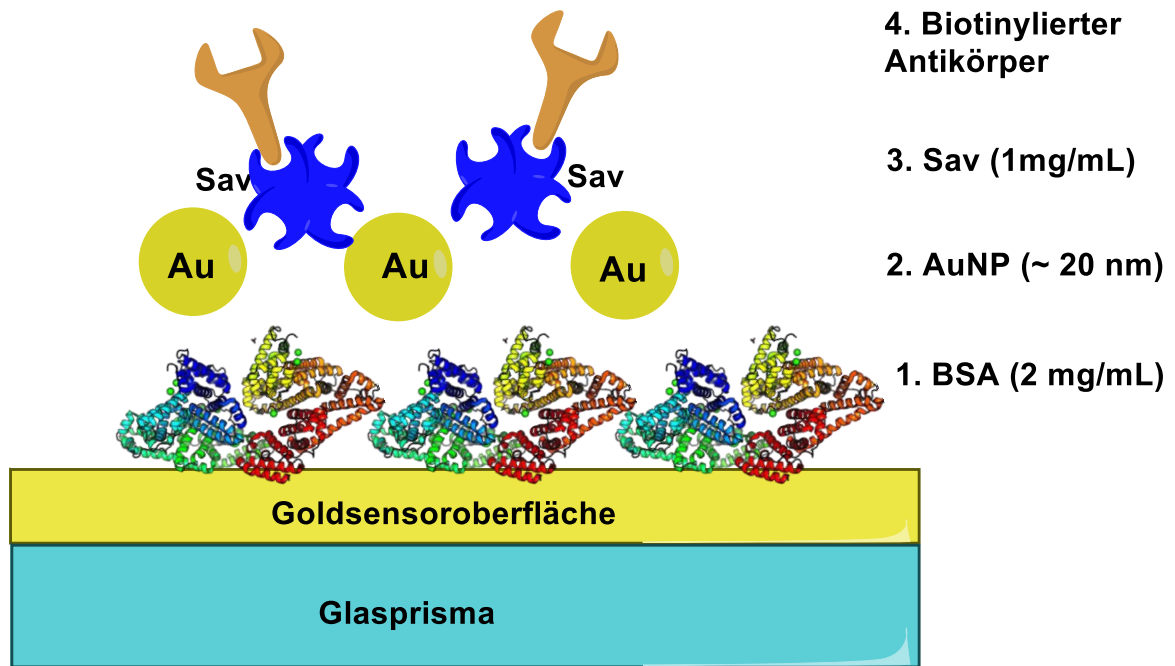


Abbildung 50: Schematischer Aufbau der SPR-Studien für Gold-BSA-Sandwich-Oberflächen.

Dieser zeigte eine starke Bindung an Streptavidin. Aufgrund der hohen Beladung von Streptavidin zu Biotin wurden für die Bindung des Anti- α -Albumin (1 mg/mL) eine Winkelverschiebung von ca. 129 Pixel erreicht. Der für einen Antikörper relativ hohe Wert weist auf eine relativ dichte Beladung hin. Abschließend wurde eine Testreihe verschiedener Antikörperkonzentrationen und deren Bindung an Au/BSA/AuNP/Sav-Systeme untersucht worden (Abb. 51).

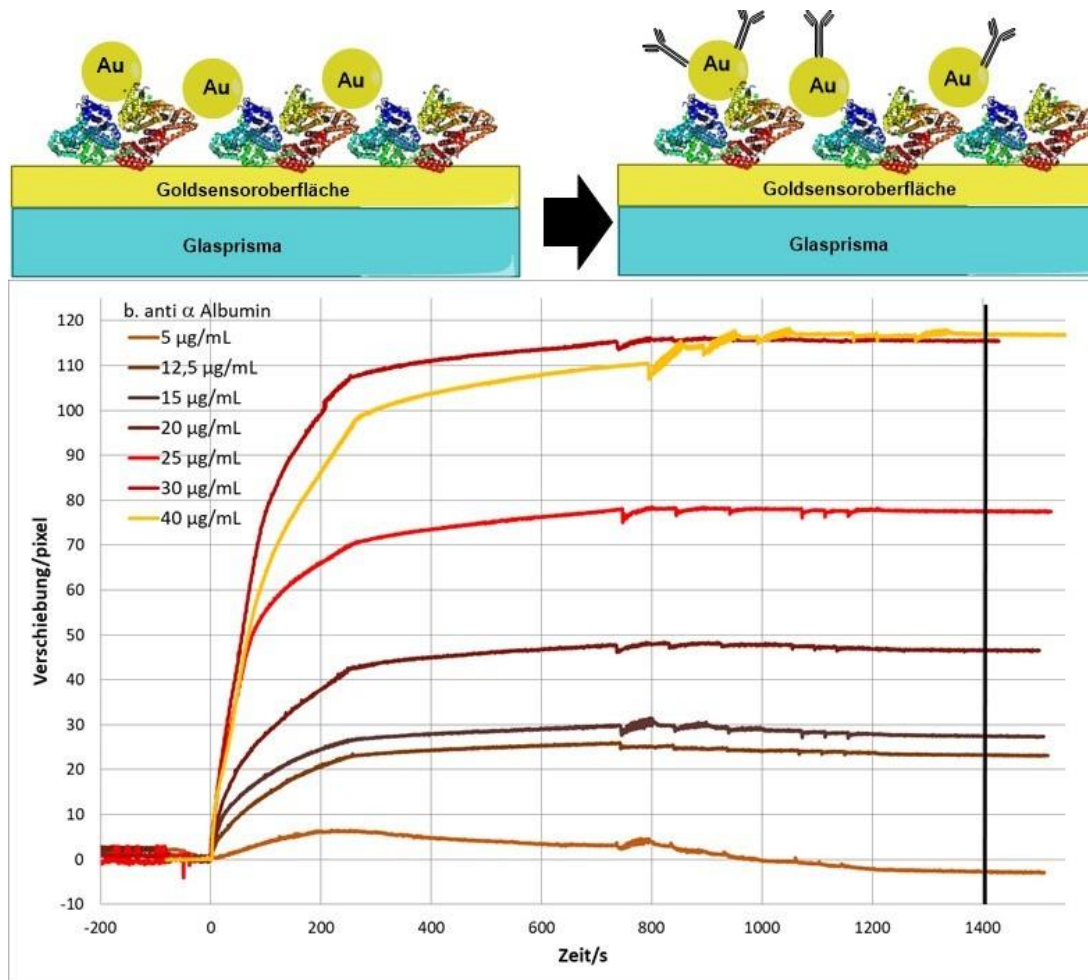


Abbildung 51: SPR Sensogramm: Bindungsstudien von Anti-Albumin an Sav auf einer Au/BSA/AuNP Oberfläche (Nullpunkt dieser Abb. wurde auf 1400 s des Gesamtsensogramms gesetzt).

Bereits bei einer Konzentration von ca. 0,3 mg/mL Anti-Albumin konnte eine Sättigung der Oberfläche erreicht werden. Im mittleren Bereich der gewählten Konzentrationsreihe ist zudem ein linearer Zusammenhang zwischen Winkeländerung sowie Konzentration des Antikörpers zu beobachten. Dieser Zusammenhang wurde durch eine lineare Auftragung von erreichter Winkelverschiebung gegen die Konzentration bestätigt. Der Gesamtverlauf über alle Konzentrationen lässt sich mit einer sigmoidalen Funktion beschreiben (Abb. 52).

Daraus lässt sich die ideale Konzentration für anschließende Experiment bzw. Assays ableiten, ohne im Überschuss mit zumeist teuren und relativ sensiblen Antikörpern zu arbeiten.

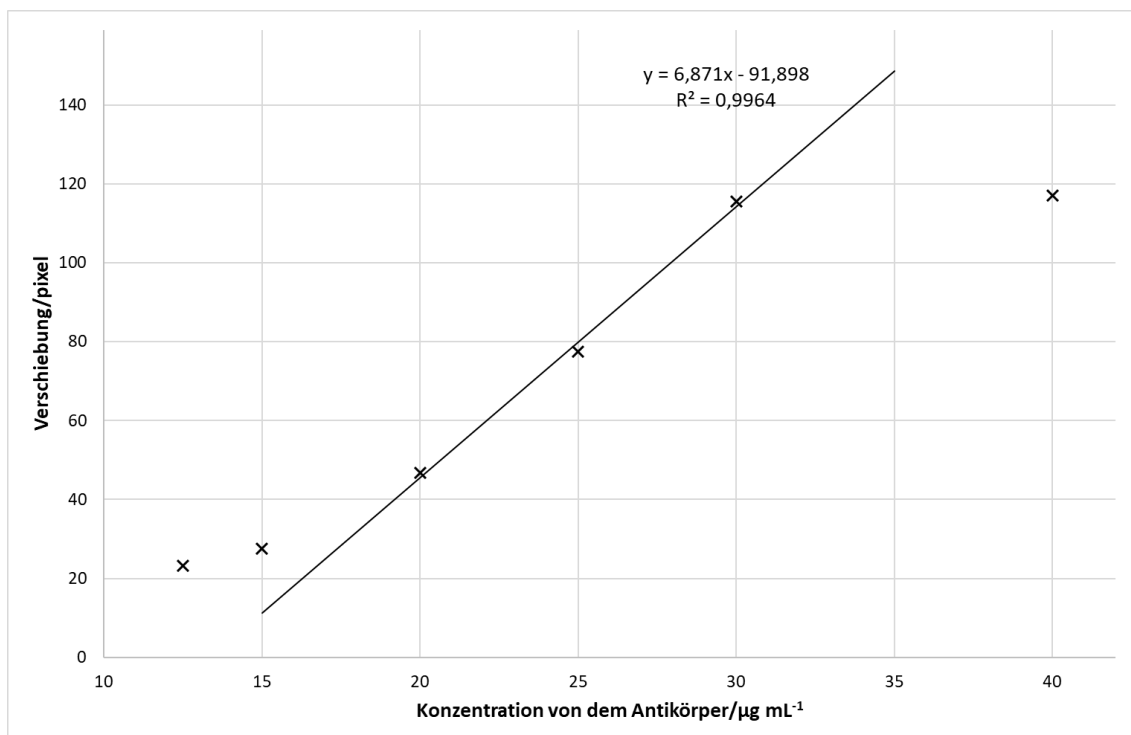


Abbildung 52: Winkelverschiebung bei der Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen von Anti-Albumin (Betrachtung des Bindungsereignisses von Anti-Albumin); Schritte vor der Zugabe von Anti-Albumin: Immobilisierung mit BSA (2 mg/mL), AuNP (~20 nm), Sav (1 mg/mL).

4.6.3 Oberflächenmodifikation Thiol- und Carboxymethyl-modifizierten Polysacchariden (MA-CM)

Die unterschiedlich langen und verschiedenartig verzweigten Polysaccharide wurden nach ihrer Carboxymethylierung sowie Thiol-Modifikation auf ihre Wechselwirkung mit der Goldsensoroberfläche der SPR-Chips getestet. Die sollte Aufschluss darüber geben, ob die Modifikation mittels Mercaptoanilin (MA) für SPR-Untersuchungen tauglich ist. Es zeigte sich für alle der hergestellten CM-Polysaccharide, dass eine Modifikation mittels Mercaptoanilin und die daraus resultierende Bindung an die Goldoberfläche der SPR-Chips erfolgreich verlief. Im nächsten Schritt sollten Biomoleküle kovalent auf dieser Oberfläche immobilisiert werden (Abb. 53).

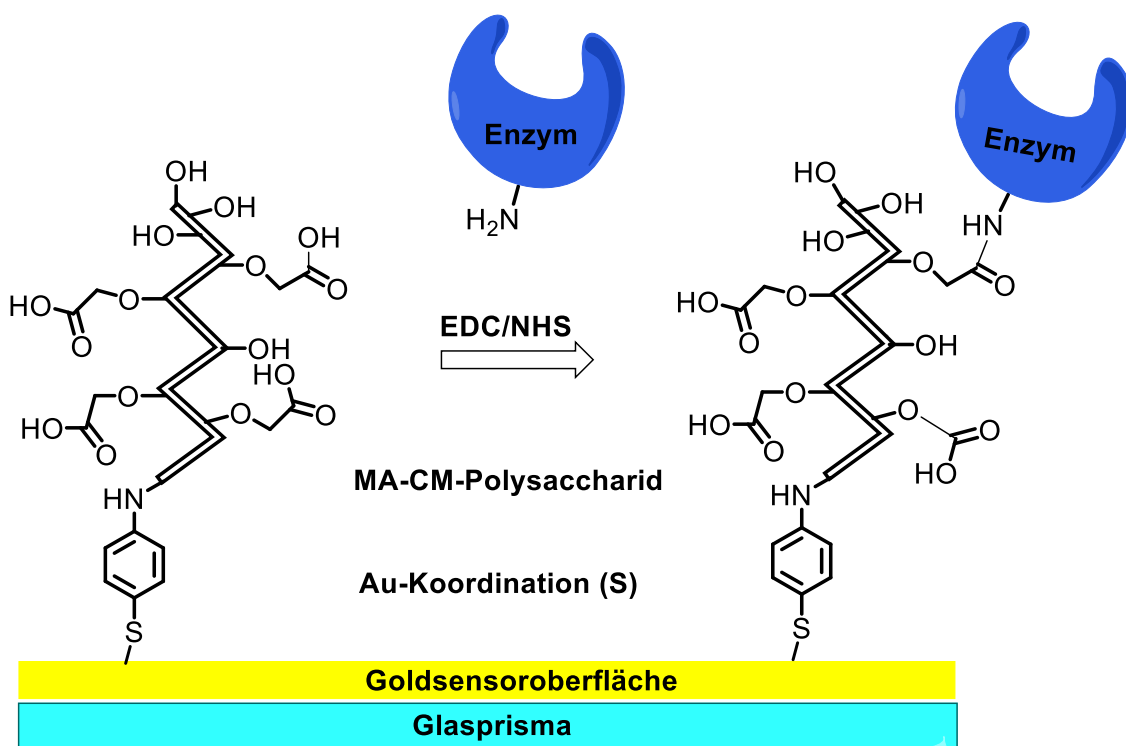


Abbildung 53: Immobilisierungsstrategie für MA-CM-Polysaccharide

Alternativ hierzu wurde getestet, ob die auf der Goldoberfläche gebundenen MA-CM-Saccharide Wechselwirkungen mit Lektinen bzw. dem Fusionsprotein, bestehend aus dem Lektin ConA sowie Streptavidin, zeigen. Es konnte hierbei veranschaulicht werden, dass sowohl die kovalente Immobilisierung als auch die Wechselwirkung mit ConA-Sav eine mögliche Methode der Bindung an diesen Typ von Oberfläche darstellt (Abb. 54).

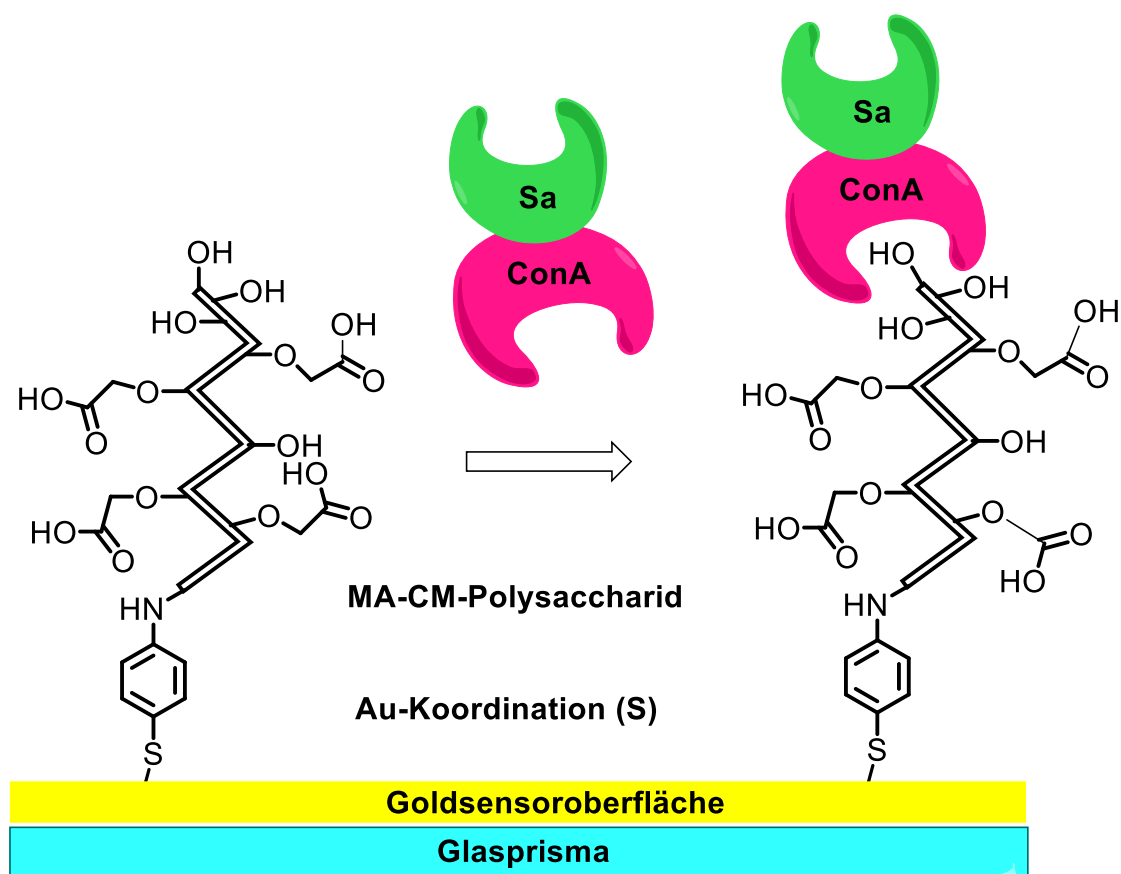


Abbildung 54: Bindung von ConA-Sav an MA-CM-Sacchariden.

Die eingesetzten, modifizierten Saccharide zeigten trotz unterschiedlicher Strukturen sehr ähnliche Bindungscharakteristika, sowohl bei der kovalenten Immobilisierung als auch der Immobilisierung mittels Fusionsprotein. Die Bindungsraten für die CMT-Polysaccharide unterlagen zwar geringen Schwankungen innerhalb und zwischen den Typen, jedoch lagen die Messwerte typischerweise im Bereich von ca. 30-42 Pixel, unabhängig von der molaren Masse (Abb. 55). Dies lässt die Vermutung zu, dass sich eine für alle Saccharide ähnliche Matrix auf der Goldoberfläche ausgebildet hat.

Das Fusionsprotein ConA-Sav zeigte eine relativ hohe Beladung (30-50 Pixel) zu den von uns etablierten Oberflächen, unabhängig von dem Eingesetzten Polysaccharid. Weiterführende Bindungsstudien mit biotinylierten Antikörpern zeigten jedoch nur eine geringe Schichtdickenzunahme an das Fusionsprotein. Zu beachten ist aber hierbei, dass das SPR-Messsignal mit zu zunehmender Entfernung von der Goldoberfläche drastisch abnimmt (nichtlinearer Zusammenhang) und bei komplexen Schichten ein geringer Anstieg des Messsignals nicht unbedingt eine geringe Zunahme der Schichtdicke bedeutet.

Es zeigte sich auch, dass hierbei, bezüglich der immobilisierten Zuckern bei den anschließenden Waschschritten, lediglich geringe Mengen von Polysaccharid abgespült werden konnten, was für eine relativ gute Oberflächenbelegung spricht. Bei wesentlich höheren Konzentrationen von MA-CM-Sacchariden (2 mg/mL) als den in diesen Versuchen eingesetzten, würde es zu einer deutlichen Abnahme des SPR-Signals beim Waschschriff kommen, da überschüssiges und nicht gebundenes, jedoch den Brechungsindex und damit den Messwert stark erhöhendes Polysaccharid, von der Oberfläche abgespült würde.

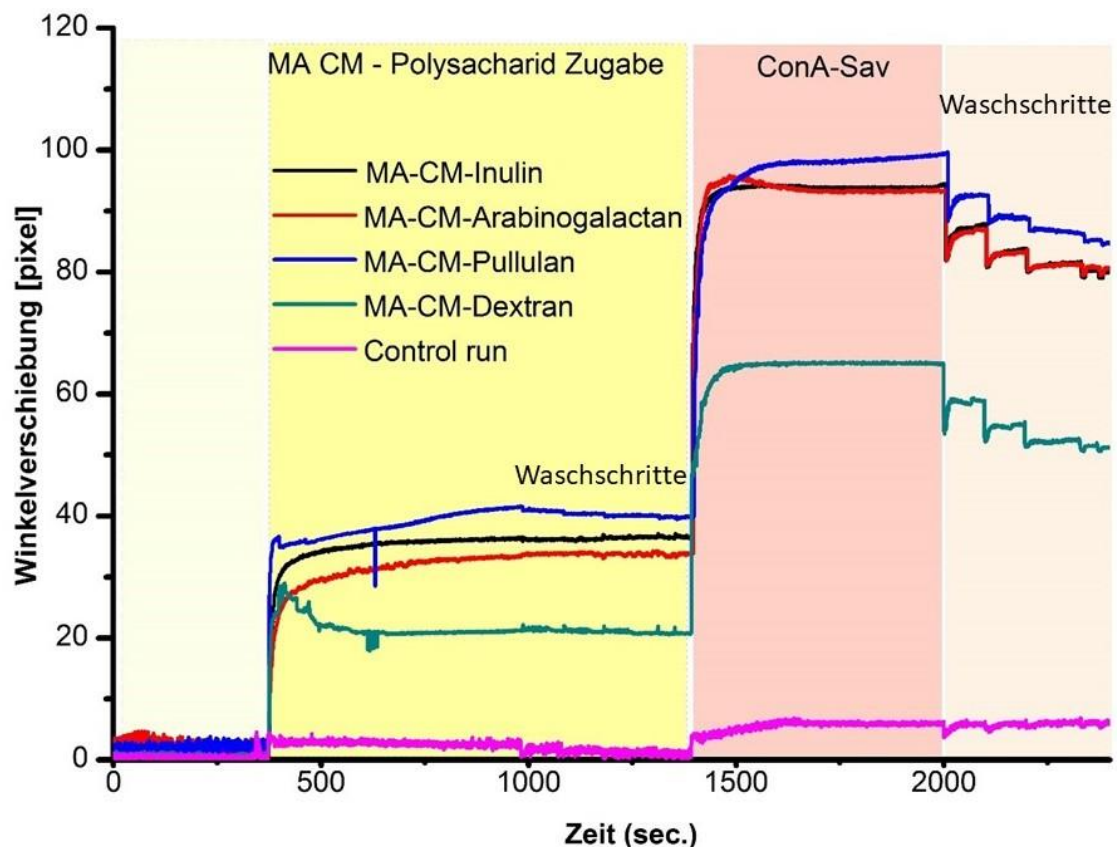


Abbildung 55: SPR Sensogramme Vergleich der Beladung von MA-CM-Polysacchariden mit ConA-Sav-Fusionsprotein.

Auf den Polysaccharid-Oberflächen wurden noch Bindungsstudien mit BSA durchgeführt; das Messsignal des BSA lag mit 10 -20 Pixeln jedoch im niedrigen Bereich. Eine ausreichende Belegung mit BSA konnte jedoch zweifelsfrei mit Anti-BSA nachgewiesen werden, was zu einer Signalzunahme von ~60 Pixel führte (Abb. 56).

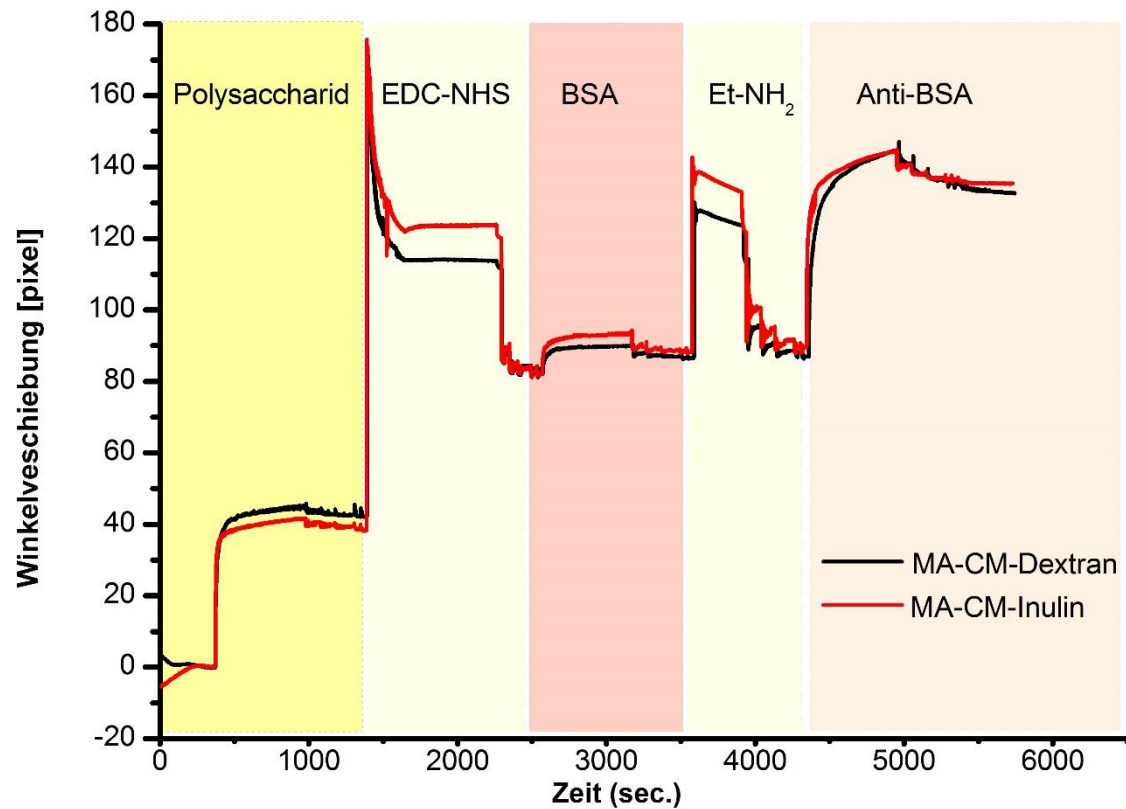


Abbildung 56: SPR Sensogramme eines BSA / Anti-BSA Assays auf MA-CM-Oberflächen. Et-NH₂: Blockierung unspezifischer Bindungen.

Bei Betrachtung der Schichtdickenzunahme nach Immobilisierung der Polysaccharide gibt es grundsätzlich zwei unterschiedliche Typen der Anlagerung (Abb. 57):

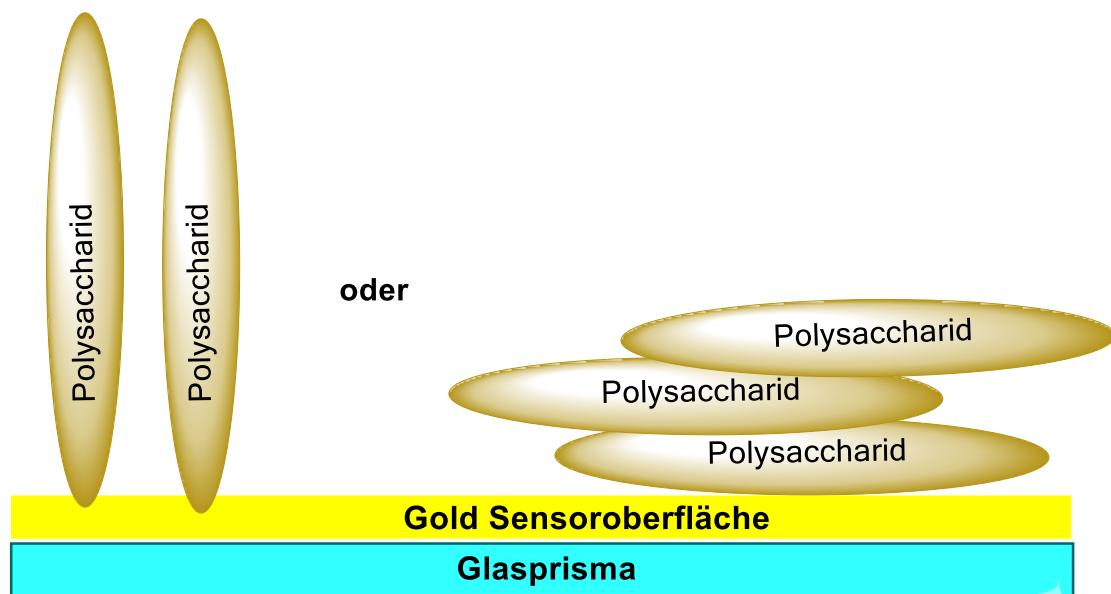


Abbildung 57: Mögliche Anordnungen von Polysacchariden auf der SPR-Oberfläche.

Wahrscheinlich führen ungeordnete Anlagerungen wie rechts in der Abb. dargestellt zu eher geringeren Beladungsdichten. Die Methode zur Immobilisierung von Dextran auf Goldoberflächen mittels Epichlorhydrin und zuvor als Monolayer aufgebrachtem Mercaptoalkohol nach Löfas *et al.* könnte eventuell zu höheren Beladungsdichten führen.^[138] Bei der Route von Löfas *et al.* wird zunächst ein Merkaptoalkohol auf der Goldoberfläche immobilisiert, während die gebildeten Monolayer in einem zweiten Schritt mittels Epichlorhydrin zu Oximethyl-oxirane umgesetzt werden. Die hohe Reaktivität dieser Epoxid-modifizierten Oberfläche erlaubt nun das kovalente Immobilisieren von gut bis mäßig nukleophilen Verbindungen wie Sacchariden.

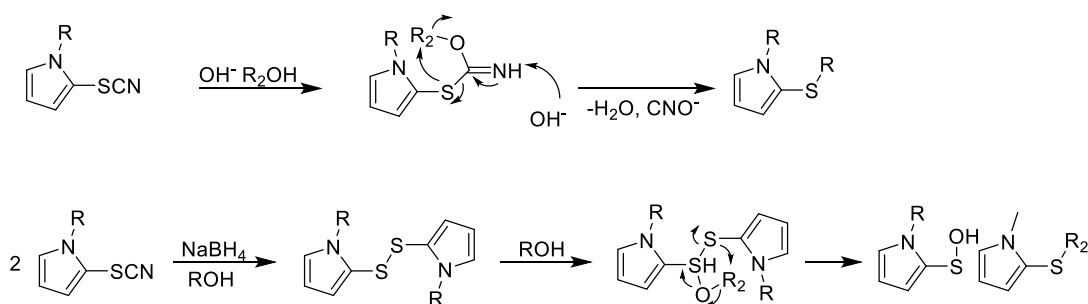
5 Zusammenfassende Diskussion

Aufgrund der vielseitigen Themengebiete, die in dieser Arbeit behandelt wurden, werden die Ergebnisse nochmals zusammenfassend diskutiert. Einleitend wird die Entwicklung und Erkenntnisse der Synthesen, ausgehend von organischen Thiocyanaten, als zentrales Thema der Arbeit diskutiert. Als zweites Unterkapitel sollen die Reaktionen und Produkte der alternativen Syntheseroute des roten Farbstoffs via elementarem Schwefel sowie Schwefel-monochlorid erörtert werden, wobei für zukünftige Arbeiten in diesem Bereich hilfreiche Erkenntnisse gewonnen wurden. Als dritten Teil der Diskussion wird die Extraktion der Naturstoffe betrachtet. Die kristallographische Untersuchung des synthetischen, ebenso des aus *Allium*-Proben gewonnen roten Farbstoffs, bildet den vierten Teil dieses Kapitels. HPLC-Studien, bei denen mögliche Schwerpunkte für weitere Arbeiten in diesem Bereich aufgezeigt werden, sowie die Entwicklung von Oberflächen, die von der Arbeit mit Pyrrolen und der Gattung *Allium* inspiriert wurden, bilden den Abschluss. Abschließend werden die SPR-Experimente kurz diskutiert.

5.1 Reaktionen von Thiocyanaten und Darstellung des roten Farbstoffs

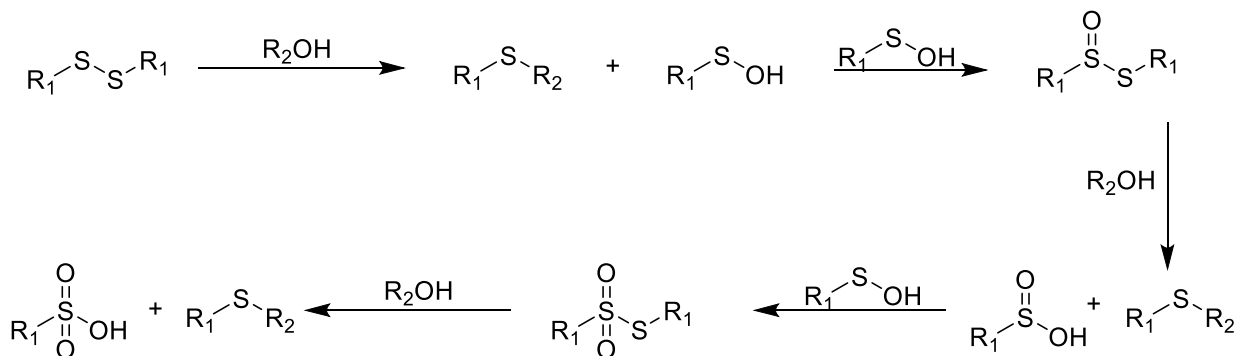
Durch die Ergebnisse und Produkte, die während der Reaktionen von Thiocyanaten erhalten wurden, konnte ein Mechanismus für die verschiedenen anfallenden Produkte (Alkylthioether sowie Carbonimidothioate) postuliert werden (Schema 32). Bei den Carbonimidothioaten handelt es sich jedoch nur um ein Nebenprodukt, das mit maximal 30% Ausbeute anfällt. Grant und Snyder konnten ein ähnliches Verhalten bei 3-Thiocyanatoindol beobachten; jedoch wurden diese Ergebnisse nicht näher erörtert.^[115]

Potentielle Mechanismen:



Schema 32: Postulierte Mechanismen zur Bildung der Alkylthioether sowie Carbonimidothioate.

Ausgehend von diesen zwei verschiedenen Mechanismen lässt sich Vermutung anstellen, dass beide Reaktionsrouten ablaufen können, der Mechanismus via Disulfid jedoch wahrscheinlicher ist. Erklärbar wären in diesem Falle jedoch nur Ausbeuten von maximal 50 % des theoretischen Wertes, wobei hingegen bei einigen Reaktionen dieses Typs Ausbeuten über 60 % erhalten wurden. Diese Tatsache macht es nötig, weitere potentielle Bildungsmechanismen bzw. Pfade in Betracht zu ziehen (Schema 33) oder auch beide Reaktionen als parallel ablaufend zu betrachten.^[139]



Schema 33: Weitere Reaktion der bei der Hydrolyse von Thiocyanaten gebildeten Sulfensäure.

Arbeiten von Olsen *et al.* zeigten, dass Thiocyanate in alkoholischem Medium zur Bildung von Thioethern in der Lage sind, jedoch wurde nicht auf die parallel ablaufende Bildung von Disulfiden eingegangen. Der dabei postulierte Mechanismus geht auch von Carbonimidothioaten aus, wurde jedoch als „zeistufige“ Reaktion postuliert.^[140] Weiterhin taucht dieser Typus vereinzelt in der Literatur auf, zumeist als „Nebenreaktion“ z.B. bei hochsubstituierten Pyrrolthiocyanaten.^[141]

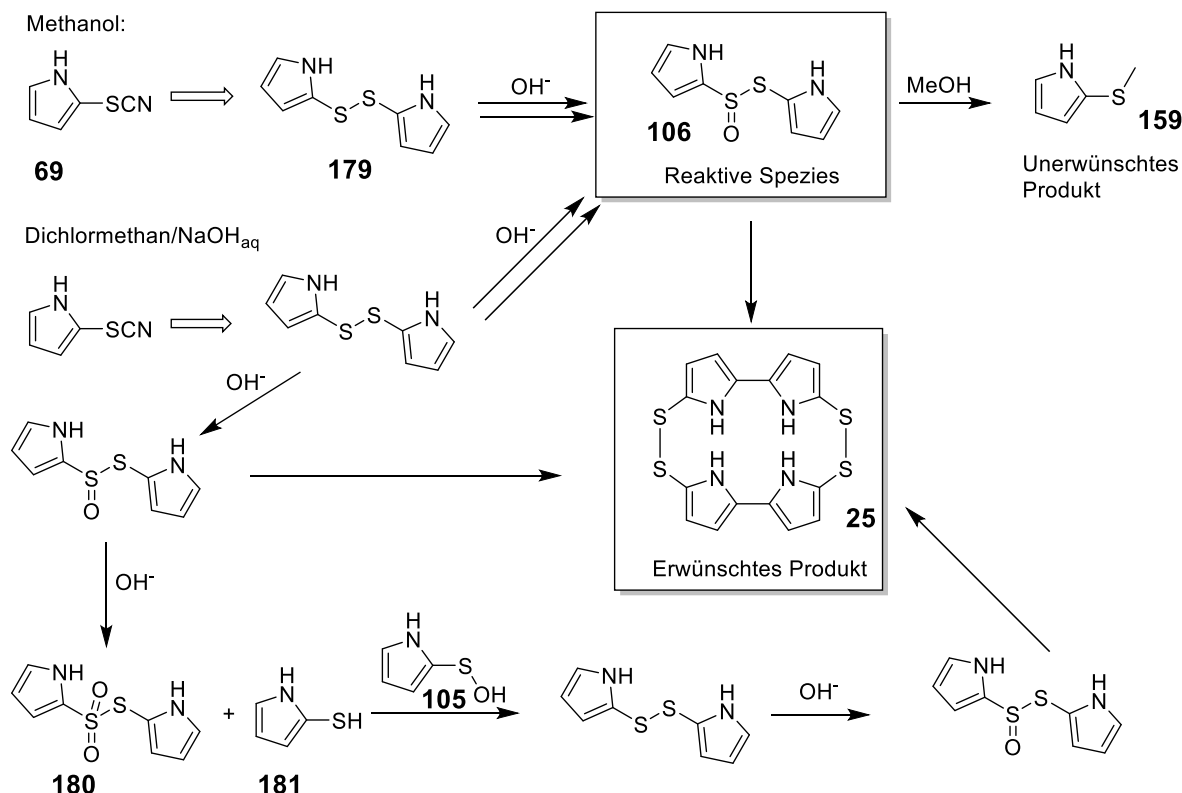
Donovan *et al.* diskutieren sowohl die klassische Bildung von Thiolen sowie Sulfensäuren bei der Hydrolyse von Disulfiden als auch eine potentielle unsymmetrische Spaltung der S-S-Bindung.^[139] Danehy *et al.* diskutieren, dass Thiole und Sulfonsäuren als Hauptprodukte der alkalischen Hydrolyse von aliphatischen Disulfiden (via Thiosulfinate) gebildet werden. Auch in dieser Arbeit wurde ein ähnlicher Mechanismus zur Beschreibung der Reaktionsabläufe postuliert.^[142]

Es wurden bei einer Analyse des Reaktionsansatzes dieses Reaktionstyps sowohl die Massen der Sulfon- als auch die Massen der korrespondierenden Sulfinsäuren (ESI negativ mode) gefunden, was diesen postulierten Mechanismus sehr wahrscheinlich macht. Der im basischen Milieu über instabile Pyrrol-Disulfide ablaufende Mechanismus kann somit als korrekt betrachtet werden. Weitere Ergebnisse durch die Umsetzung von Thienyldisulfid und dessen Disproportionierung bestätigen diesen Verlauf der Reaktion zusätzlich.

Die Reaktion hätte, bezogen auf das eingesetzte Thiocyanat, somit eine maximale Ausbeute von 75 % und wäre dadurch eine durchaus denkbare Alternative zu der „traditionellen“ Synthese dieser Thioether mittels Alkylhalogenide. Es werden somit keine relativ teuren Halogenide, wie Iodmethan, benötigt, da das Lösungsmittel (Alkohol) sowohl Alkylierungsmittel als auch Lösungsmittel ist.

Diese Erkenntnisse spiegeln sich auch in der Betrachtung der Bildung des roten Farbstoffes (Tetrathiaporphyrin) wieder. Für die Synthese ist zumeist Methanol als Lösungsmittel verwendet worden, obwohl sich zeigte, dass die Synthese in zweiphasigen Systemen eine höhere Ausbeute liefert, wobei als Komponenten Dichlormethan sowie eine Natriumhydroxidlösung eingesetzt wurden. Bei diesem System kann es aufgrund der Absenz einer alkoholischen Komponente zu einer weiteren Reaktion mit Wasser kommen, wobei in diesem Falle die aktive Spezies das Thiosulfinat länger im System erhalten bleibt und sich lediglich ein Gleichgewicht zwischen dimerer Verbindung und den Hydrolyseprodukten einstellt. Es kann dadurch zu keiner Reaktion kommen, bei der ein Thioether

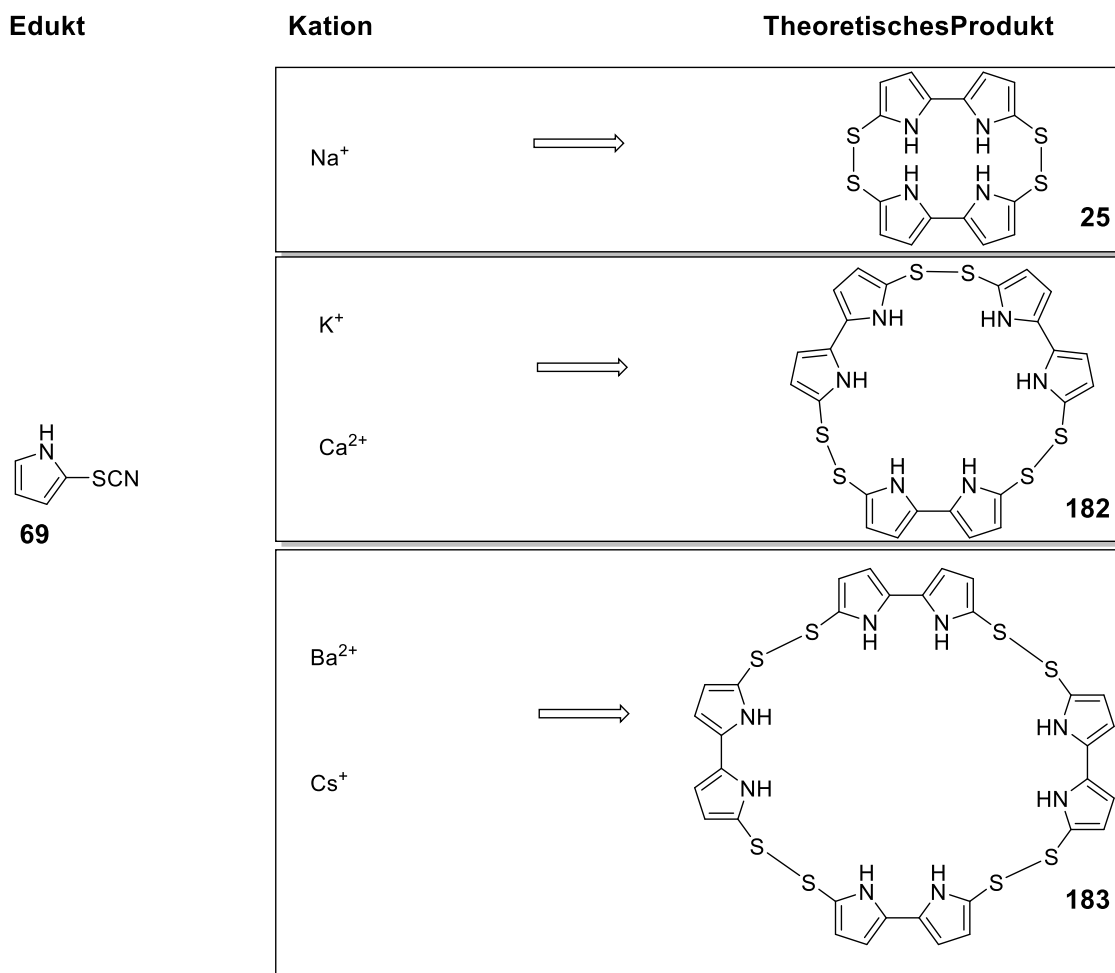
gebildet wird, welcher aufgrund seiner höheren Stabilität dem System entzogen und somit nicht für die Bildung der tetracyclischen Strukturen genutzt wird (Schema 34).



Schema 34: Reaktionspfade in alkoholhaltigem und alkoholfreiem Medium.

In Methanol konnte auch unter reduktiven Bedingungen (NaBH_4) das erwünschte Produkt erhalten werden, jedoch nur, wenn weniger als ein Äquivalent Natriumborhydrid verwendet wurde. So sind bei zwei Äquivalenten (NaBH_4) keinerlei roter oder auch gelber Farbstoff erhalten worden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass das „Thiolat“ zu instabil ist und zu verschiedensten, nicht farbigen Produkten, wie beispielsweise anderen Polymeren, abreagiert. Die Disulfide in der Lösung, oder auch andere intermediäre Verbindungen sulfidischer Art, sind unter diesen Bedingungen jedoch in der Lage zu cyclisieren und somit eine formell oxidative C-C-Bindung zu verknüpfen. Ein entfernt ähnlicherer Reaktionstyp wurde von Tordes *et al.* beschrieben, wobei in diesem Falle unter Reduktion mittels Dikaliumcyclooctatetraen Dithiocyanatothiophen umgesetzt wurde. Bei diesen Experimenten bildete sich Tetra(thienylen-2,5)disulfid sowie polymere Produkte.^[143] Bei dieser Reaktion fand jedoch keine C-C-Bindungsverknüpfung statt sondern lediglich eine Bildung von disulfidischen Bindungen zwischen den einzelnen Thiophen-Einheiten.

Interessant wäre die Umsetzung von 3,4-disubstituierten Pyrrolen, um verschiedene Analoga des Tetrathiaporphyrins zu gewinnen. Falls bei diesen Umsetzungen Analoga erhalten werden, wäre die Reaktion deutlich durch die räumliche Anordnung der N-Substituenten limitiert. Eine weitere Möglichkeit wäre auch, dass die freien Pyrrol-NH Gruppen koordinierend wirken, um ein in Lösung befindliche Kationen wie Na^+ zu koordinieren, welches ein Template für die Bildung der tetracyclischen Verbindungen darstellt. Diese Annahme ist jedoch weniger wahrscheinlich als eine Erklärung über die Sterik, da in verschiedenen Versuchen durch Zugabe unterschiedlicher Metallkationen (K^+ , Cs^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Ba^{2+}) während der Hydrolyse des Thiocyanatopyrrols andere makrocyclische Produkte (**182** und **183**) zu erwarten wären (Schema 35); jedoch konnten keinerlei Produkte dieser Art isoliert werden.



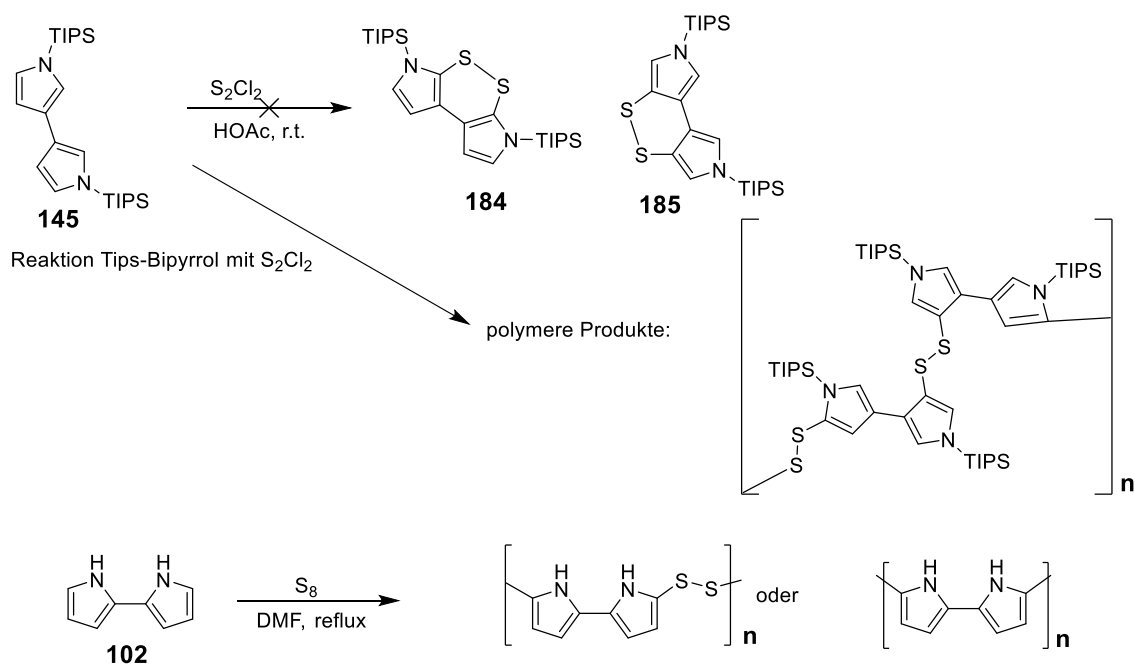
Schema 35: Potentielle makrocyclische Verbindungen bei Zugabe kationischer Templates.

Massenspektrometrische Untersuchungen der Komplexbildung der Stammverbindung (roter Farbstoff) zeigten nur eine geringe Affinität zu Kationen. Lediglich bei Hg^{2+} konnten Hinweise auf ein Komplex-Ion (ESI-MS positiv) gefunden werden. Eine mögliche Erklärung dieses Sachverhaltes wäre, dass die Komplexe schneller oxidiert bzw. hydrolysiert werden, wie das Tetrathiaporphyrin selbst.

Es wurden auch Reaktionen zwischen zwei verschiedenen Thiocyanaten (2-Thiocyanatopyrrol / N-Methyl-2-thiocyanatopyrrol) durchgeführt. Es scheint hierbei ein Gemisch zu entstehen, das maximal 2 N-Methyl-pyrrole enthält. Nähere Untersuchungen der komplexen Reaktionsmischung waren jedoch nicht möglich, weil die einzelnen Verbindungen nicht über chromatographische Verfahren getrennt werden konnten.

5.2 Umsetzung heteroaromatischer Verbindungen mit elementarem Schwefel oder Schwefelmonochlorid

Mit Indol konnten hierbei interessante Strukturen erhalten werden, wie z. B. das Hauptprodukt Biindoltetrasulfid. Die Reaktion unter gleichen Bedingungen mit Pyrrolverbindungen oder Bipyrrrolen führte jedoch fast ausschließlich zu polymeren Produkten, deren genaue Zusammensetzung nicht weiter aufgeklärt werden konnte. So konnten lediglich geringe Anteile des Eduktes (z.B. Tipspyrrol) nach chromatographischer Aufarbeitung des Reaktionsansatzes zurückgewonnen werden. Es ist davon auszugehen, dass unter den genutzten Reaktionsbedingungen die gebildeten schwefelhaltigen Verbindungen sowie die Edukte, im Falle von Bipyrrrol, schnell polymerisieren (Schema 36).



Schema 36: Mögliche Reaktionen von Bipyrrolen mit S_2Cl_2 oder elementarem Schwefel.

Mit 2,2'-Bithiophen konnte keinerlei Reaktion beobachtet werden; auch 3,3'-Bithiophen zeigte nur eine geringe Reaktionsfähigkeit unter diesen Bedingungen, wobei jedoch Verbindungen entstanden, die sowohl farbig (rot / orange) waren, als auch dem roten Farbstoff sehr ähnliche R_f Werte aufwiesen. Das ebenso charakteristische DC-„Laufverhalten“ mit leicht welligen, inhomogenem Banden konnte beobachtet werden (Abb. 58).

Es konnten jedoch nur Spuren dieser Verbindungen isoliert werden ($< 0,5$ mg), die aber nicht weiter analysiert wurden.

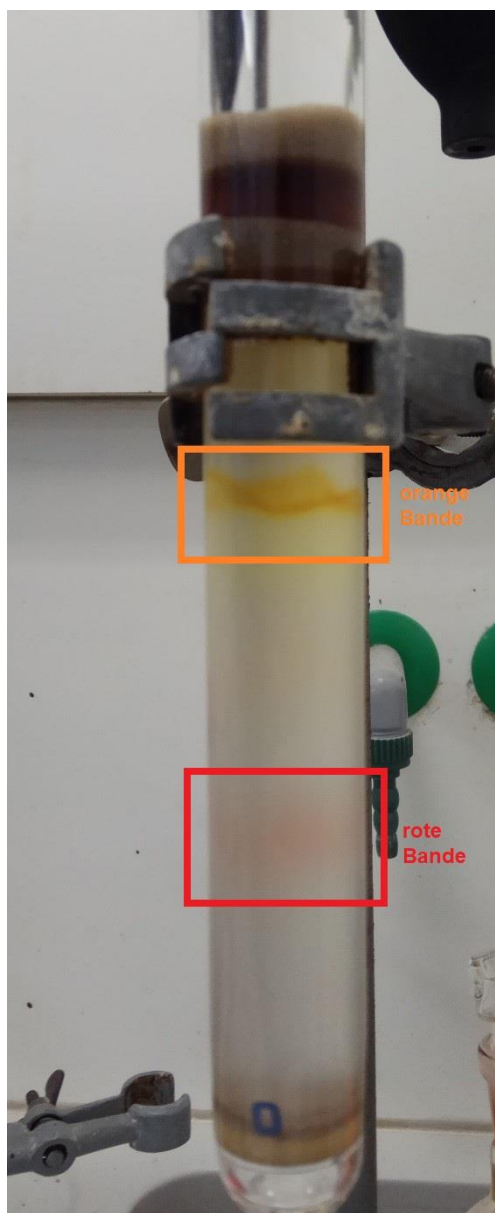


Abbildung 58: Säulenchromatographische Trennung nach Umsetzung von 3,3'-Bithiolen mit Schwefel.

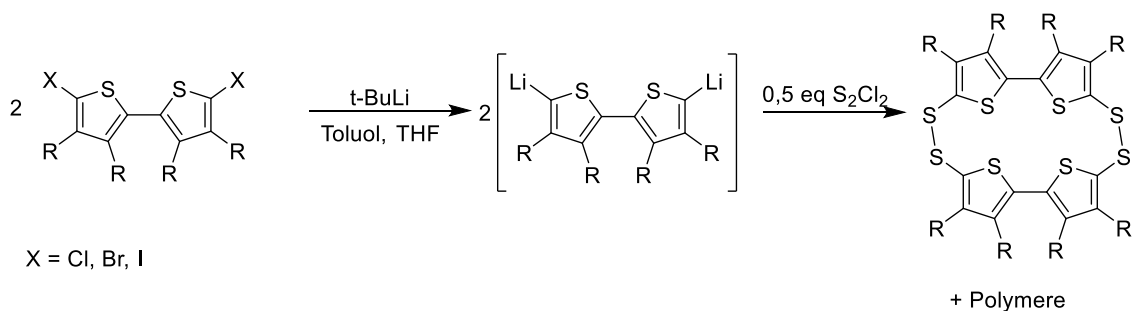
Um dieses Problem, zumindest hinsichtlich einer der beiden Bithiophene, zu lösen, wurde schließlich 5,5'-Dibrom-2,2'-bithiophen (**32**) durch einen Halogen-Metallaustausch aktiviert und mit elementarem Schwefel umgesetzt. Die hierbei erhaltenen Produkte waren säulenchromatographisch jedoch nicht zu trennen. Allerdings konnten die verschiedenen Produkte fraktioniert kristallisiert werden (Abb. 59). Der abgebildete Kristall hatte eine Kantenlänge von ca. 5 mm und kristallisierte binnen 3 Wochen aus Cyclohexan.



Abbildung 59: Gelbe schwefelhaltige Verbindung (5,5'-DiLi-2,2'-bithiophen +S₈) nach fraktionierter Kristallisation aus Cyclohexan.

Die schwefelhaltige Verbindung ist tief-gelb gefärbt, wobei es sich bei der zweiten, nadelartig kristallisierenden Verbindung, um ein Bithiophen (Br, Alkyl) handelt. Diese Methodik der fraktionierten Kristallisation von „untrennbaren“ Gemischen kann für diese Verbindungen als Alternative für präparative Trennungen genutzt werden. Da die Verbindungen eine relative hohe Neigung zur Polymerisation zeigen und präparative Säulen nach einigen Läufen wohl deutlich schädigen würden, ist die Kristallisation zu empfehlen.

Fraktionen, die scheinbar (Nachweis mittels TLC) eine Verbindung enthielten, waren nicht näher zu charakterisieren, da es sich hierbei vermutlich um polymere Verbindungen handelte. Es bleibt somit nur der Ansatz von Schroth *et al.* alkylierte Verbindungen zu nutzen, um selektiv an den gewünschten Positionen Reaktionen durchzuführen (Schema 37).



Schema 37: Theoretische Synthese von Thiophen-Analoga des RF.

Jedoch sind auch bei dieser Methode größere Mengen an Polymer angefallen.

Versuche, das Grundgerüst aus nicht aromatischen Verbindungen darzustellen, könnte gelingen, falls die Doppelbindungen bzw. Aromatizität durch Eliminierung eingeführt werden (für die Analoga des Thiophens oder Furans). Halogenierte Pyrrolidine scheiden allerdings aus. Hierbei könnte durch Einführen von Schutzgruppen am nukleophilen Stickstoff zwar die Darstellung der Edukte möglich sein, jedoch zeigte sich bei den Umsetzungen von N-Substituierten Pyrrol-Thiocyanaten, dass die Sterik eine entscheidende Rolle für die Bildung von Bisdisulfiden spielt.

5.3 Extraktion und Purifikation von schwefelhaltigen Pyrrolverbindungen

Durch die optimierte Handhabung der Proben und dem Einsatz verschiedener Lösungsmittel gelang die gezielte Extraktion der in dieser Arbeit betrachteten verschiedenen Substanzen. Bezüglich der stark fluktuierenden Ausbeuten an rotem Farbstoff ist im Besonderen der schwankende Gehalt des Pyrrolylcysteinsulfoxid anzuführen. Wobei auch der relative Gehalt, bezogen auf weitere Cysteinsulfoxide, ausschlaggebend ist; besonders das zumeist in relativ hohen Konzentrationen vorhandene Methiin. In Hinsicht auf stabile bzw. hohe Konzentrationen von Cysteinsulfoxiden ist ein dormanter Zustand der Pflanze bei der Ernte vorzuziehen, was jedoch nicht immer gewährleistet werden konnte. Besonders bei der Akquise von Proben der IPK Gatersleben wurden auch Pflanzen im vegetativen Stadium geerntet. Des Weiteren lässt sich hierbei auch eine Abhängigkeit von der Matrix und den vorhandenen Fructanen postulieren.

Besonders auffällig war bei säulenchromatographischen Trennung von *Allium*-Extrakten, dass eine der charakteristischsten Banden, eine gelbe Bande mit dem höchsten R_f Wert, (Fraktion 1) nicht in allen Proben zu finden war. Dieser gelbe Farbstoff wurde, bis auf wenige Ausnahmen, bei *A. giganteum*-Extrakten identifiziert, vor allem den bei Proben, die von Prof. Dr. *Keusgen* auf Tadschikistan-Expeditionen gesammelt wurden. Eine Charakterisierung konnte aufgrund von sehr geringen Mengen dieser Substanz nicht vorgenommen werden. Verglichen mit dem charakterisierten Tetrathiaporphyrin lag die Masse dieser Fraktion um ein fünf bis zehnfaches niedriger, da Extrakte von 20,0 g-Chargen *Allium*-Lyophilisat Ausbeuten an gelbem Farbstoff nur in sehr kleinen Spuren lieferten, die nicht näher analysiert werden konnten.

Diese Färbung erlaubt die Spekulation, dass es sich hierbei um ein Tetrasulfid oder ein Dithiin handeln könnte. Weitere denkbare Verbindungen sind natürlich auch offenkettige Verbindungen sowie Di- oder Tetrasulfide, die ausgehend von der Pyrrolsulfensäure sowie Methylsulfensäure hervorgehen, welche in den untersuchten Spezies, rückgeschlossen aus den Gehalten der Cysteinsulfoxide, die höchste Konzentration aufweisen.

Die Reinigung des roten Farbstoffes wurde durch säulenchromatographische Trennung erreicht. Es zeigte sich hierbei jedoch, dass Eluenten, welche eine höhere Polarität als ein Gemisch von Cyclohexan/Ethylacetat 20/1 haben, verunreinigten roten Farbstoff liefer-

ten, welcher nicht zur Kristallisation gebracht werden konnte. Wurde der Farbstofffraktion mittels reinem Ethylacetat eluiert, so war das Produkt durch eine Vielzahl an Verbindungen verunreinigt und zersetzte sich schneller als reine Proben des roten Farbstoffes.

Die Masse des postulierten Lactylpyrrolsulfoxid konnte durch HRMS-Analytik bestätigt werden; auch eine Routine für die HPLC- Trennung gereinigter Extrakte wurde entwickelt. Allerdings zeigte sich, dass in diesen Extrakten nur sehr geringe Mengen dieser Verbindung zu finden waren. Insgesamt wurden mehr als 200 Gramm Zwiebel für die Herstellung von Extrakten verwendet. Die Gesamtausbeute der Verbindung nach präparativer HPLC lag im Bereich der Messungenauigkeit der analytischen Waage (~0,5 mg). Die im Folgenden gezeigten Chromatogramme zeigen die zuvor festgestellte, starke pH-Abhängigkeit der Trennung der einzelnen Verbindungen auf Aminophasen. Die Absorption der bei 1,6 Min. eluierenden Fraktion scheint im schwach basischen Bereich wesentlich geringer als im sauren Milieu zu sein.

Die selektive Extraktion der lyophilisierten Proben erlaubte, sowohl das Tetrathiaporphyrin als auch PySOLac zu isolieren, ohne die jeweils andere Verbindung während der Aufarbeitung zu zerstören. Besonders das Tetrathiaporphyrin zeigte eine hohe Affinität zu den für die Aufreinigung von PySOLac verwendeten Ionenaustauscherharzen. Dieses lagerte sich während dem Auftragen der Proben in das Harz ein und zeigte eine zuerst tiefviolette und nach wenigen Min. irreversibel schwarz (Polymerisation).

5.4 Kristallographische Analysen

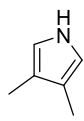
Die Aufgabe der Promotionsarbeit, die Kristallstruktur des RF zu ermitteln, konnte letztendlich durch Kristallisation der Verbindung und anschließende Kristallographie erreicht werden. Die Wahl des Lösungsmittels spielte bei den Kristallisationsversuchen die wichtigste Rolle. Zwar konnten aus allen gemessenen Kristallen dieselbe Struktur für den roten Farbstoff erhalten werden, jedoch zeigten die verschiedenen Kristalle unterschiedliche Streueigenschaften und zum Teil auch andere Einheitszellen. Einige der vermessenen Kristalle waren aufgrund schlechter Auflösung ($r > 5\%$) nicht publikationswürdig. Es wurden zum Teil auch Einheitszellen mit Substanzen, deren genaue Struktur nicht ermittelbar war, bei der Kristallisation aus Gemischen von Cyclohexan/Ethylacetat erhalten. Essentiell für die Kristallisation schienen einer der folgenden Parameter: Aromatisches LM (Benzol) oder die Möglichkeit der Wasserstoffbrückenbindung (Ethylacetat). Peroxid-bildende Ether führten binnen kürzester Zeit zu einer vollkommenen Polymerisation der Verbindung; genauso waren unterschiedliche Alkohole für die Kristallisation ungeeignet. Ein interessanter Versuch wären *Soaking*-Experimente mit verschiedenen Metallsalzen, um die Ergebnisse der Massenspektrometrischen-Studien, gerade hinsichtlich der Komplexbildung, entweder zu untermauern oder gegebenenfalls zu widerlegen.

Ohne Zusatz der oben genannten, geeigneten Lösungsmittel war die Kristallisations-Rate auch bei $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ verschwindend gering. Einzig eine Probe von insgesamt ca. 50 zeigte nach einigen Monaten Anzeichen von kleinen Kristalliten. Der Grund für diese relativ langsame Kristallisation könnte in der treppenartigen Struktur des Moleküls zu suchen sein. Bei höheren Temperaturen ändert sich durch Schwingung des Moleküls der (CSS)Bindungswinkel, was die Ausbildung einer kristallinen Struktur vermutlich stark erschwert.

Sollten Analoga der Tetrathiaporphyrine dargestellt werden, so könnten Verbindungen, die eine 3,4-Disubstitution aufweisen, die aussichtsreichsten Kandidaten darstellen. Die Ergebnisse der Arbeit unterstreichen, dass eine freie NH-Gruppe für die Bildung von Tetrathiaporphyrinen aus Pyrrolthiocyanaten unter den gewählten Bedingungen erforderlich ist. Des Weiteren wären elektronenarme bzw. ärmere Systeme empfehlenswert, da hierbei von einer geringeren Anfälligkeit gegenüber Oxidation durch Luftsauerstoff ausgegangen werden kann.

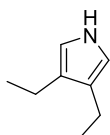
Einige der wohl gut für die Synthese von Thiaporphyrin-Analoga geeignete Pyrrole (**186-192**) sind in Abb. 60 dargestellt.

Elektronenreiche disubstituierte Pyrrole



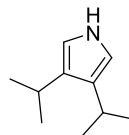
186

3,4-Dimethyl-1*H*-pyrrol



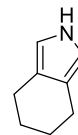
187

3,4-Diethyl-1*H*-pyrrol



188

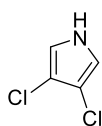
3,4-Diisopropyl-1*H*-pyrrol



189

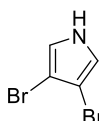
4,5,6,7-Tetrahydro-2*H*-isoindol

Elektronenarme disubstituierte Pyrrole



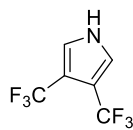
190

3,4-Dichlor-1*H*-pyrrol



191

3,4-Dibrom-1*H*-pyrrol



192

3,4-Bis(trifluormethyl)-1*H*-pyrrol

Abbildung 60: Verschiedene, für die Synthese von Tetrathiaporphyrin-Analoga potentiell geeignete Pyrrole.

5.5 Potentielle Funktion des roten Farbstoffs in der Natur und mögliche Anwendungsgebiete

Nach der endgültigen Klärung der Struktur und der Etablierung einer reproduzierbaren Syntheseroute können in weiteren Arbeiten gezielt Tests der biologischen Aktivität angestrebt werden. Neben der von *J. Jedelska* (Dissertation, Universität Marburg, Pharmaceutical value of onions (*Allium* L.) and related species of Central Asia, 2007) geklärten, hohen antioxidativen Eigenschaften der Substanz, konnten während dieser Arbeit zudem weitere Funktionen in der Natur postuliert werden.

So könnte sich aufgrund der Instabilität der Verbindung nach einer Verletzung der Pflanze eine Art natürlicher Wundverschluss bilden. Biindoltetrasulfid, eine entfernt verwandte Substanz, zeigt eine starke fungizide sowie bakterizide Wirkung. Somit könnte der rote Farbstoff ähnliche Eigenschaften aufweisen, insbesondere im Hinblick auf das durch Oxidation entstehende Polymer, welches einen hohen Massenanteil an Schwefel aufweist und somit an seiner Oberfläche durch weitere Oxidation aktive Schwefelverbindungen, wie Sulfensäuren oder Sulfinsäure, freisetzen kann. Eine Metallionen-koordinierende Wirkung des Films kann ebenso angenommen werden. Weitere, oder von den genannten sich stark unterscheidende, Wirkmodi sind durchaus denkbar. Eine antibiotische Aktivität des Polymers würde sich jedoch nur bei einem direkten Kontakt mit einem Mikroorganismus ergeben; der Effekt wäre also nur lokal sehr begrenzt.

5.6 HPLC-Untersuchungen

Für die HPLC-chromatographische Trennung des roten Farbstoffes wurden verschiedenste Phasen (C18, Amino, PFP) getestet, jedoch zeigte keine eine akzeptable Trennleistung für die Verbindung. Hierbei lässt sich der Einfluss des Puffers bzw. pH-Wertes des Laufmittels sowie der stationären Phase diskutieren. Bei der Normalphasen-Trennung der Verbindung auf nicht deaktiviertem Silikagel zeigt sich zwar eine langsame Zersetzung; allerdings können scharfe Banden erhalten werden, was vermutlich auf das azide Milieu zurückzuführen ist. Bei Umkehrphasen und MeCN oder MeOH als Lösungsmittel lassen sich nur sehr breite Banden erhalten, auch bei geringen bis geringsten Konzentrationen. Die Zugabe von TFA zum Eluenten führt zur schnellen Zersetzung der Verbindung. Als die potentiell geeignetste Säule für die HPLC wird eine Phase postuliert, durch deren zwitterionischen Charakter eine scharfe Trennung bei der Verwendung von

Ammonium-acetat-Puffern möglich sein sollte. Beispiele für einen solchen Säulentyp wären HILIC-Säulen, die aber in dieser Arbeit nicht getestet wurden.

Bei der Trennung der stark polaren Verbindungen in den *Allium*-Extrakten konnten hingegen große Fortschritte erzielt werden. So wurde durch die vorherige Konzentration und Reinigung der Sulfoxide durch Ionenaustauschchromatographie der Einfluss der Matrix (diverse Fructane bzw. Saccharide) verringert und dadurch die Verwendung von Aminophasen zur Trennung dieser Verbindungen ermöglicht. Problematisch jedoch blieb der starke Einfluss des pH-Wertes der Extrakt-Lösung, da bei zu niedrigem pH-Wert keine scharfe Trennung der einzelnen Pyrrolsulfoxidverbindungen erreicht werden konnte. In neutraler oder basischer Lösung hingegen zeigte sich ein ausreichendes Trennverhalten der Aminophasen. Auch als problematisch stellte sich dabei heraus, dass die durch Ionentauscher gereinigten Extrakte auch nach Einstellen des pH-Wertes nicht komplett vom Lösungsmittel zu befreien waren. Es kam dabei auch bei Verwendung eines Lyophilisators zur Entfernung von letzten Resten an Wasser zu einer fast vollständigen Polymerisation der Verbindungen. Das hierbei erhaltene schwarz-grüne Produkt war in allen getesteten Lösungsmitteln unlöslich und wurde daher nicht weiter untersucht.

5.7 Entwicklung von Oberflächenstrukturen für die SPR

Die verschiedenen Stadien der Entwicklung von Oberflächen korrespondiert teilweise mit den Erkenntnissen, die im Bereich der Synthese und der Analytik von Pyrrolverbindungen erhalten wurden. So diente für die erste der erforschten Methoden zur Modifikation von Oberflächen die Instabilität der Pyrrolverbindungen, mit denen täglich gearbeitet wurde, als Inspiration. Die Affinität verschiedener Proteine oder schwefelhaltiger Verbindungen zu Gold oder anderen Metallen wurde der Anstoß für das BSA-AuNP-Projekt. Die in *Allium*-Extrakten zu findenden Fructane, welche die Reinigung der stark polaren Pyrrolschwefelverbindungen erschwerten, gaben den Ausschlag für die letzte Stufe der Entwicklung für biosensorische Anwendungen, die MA-CM-Polysaccharide.

Die drei, im Arbeitskreis gemeinsam mit D. Vornicescu entwickelten Oberflächen, zeigten alle eine gute Performance hinsichtlich der Immobilisierung von Biomolekülen.

5.7.1 Entwicklung von Polypyrrolooberflächen

Die Polymerisation ist hierbei der einzige problematische Schritt dieser Methode. Weil kein Potentio- bzw. Glavanostat zu exakten Überwachung des Stromes und der Ladung eingesetzt wurde, zeigte sich während der Elektropolymerisation, dass durch zu lange Polymerisationszeiten die Schichten zu dick für etwaige SPR Messungen werden können. Um somit wirklich fast 100 % homogen beschichtete Prismen zu erhalten, sollte ein beispielsweise Palmsens[®]-Potentiostat zur Überwachung der Filmbildung eingesetzt werden. Für eine noch genauere Methode mit Echtzeit-Überwachung der Schichtdicke, könnten SPR-Chips mit einem elektrischen Kontakt modifiziert und so eine dünne Kathode hergestellt werden, die in den einzelnen Kanälen positioniert werden kann (Abb. 61). Durch die Messung des Stroms bei konstanter Spannung ist somit eine gute Abschätzung des Reaktionsfortschritts möglich. Nach der Bildung eines „PPy Monolayers“ sinkt der Strom stark ab; jedoch fällt er durch die Leitfähigkeit des PPy selbst nicht auf Null ab. Ab diesem Zeitpunkt beginnt die Bildung einer vielschichtigen, teils zerklüfteten Oberfläche. Da dieser Vorgang im SPR-Gerät durchgeführt werden kann, wird parallel dazu die Zunahme der Schichtdicke aufgezeichnet.

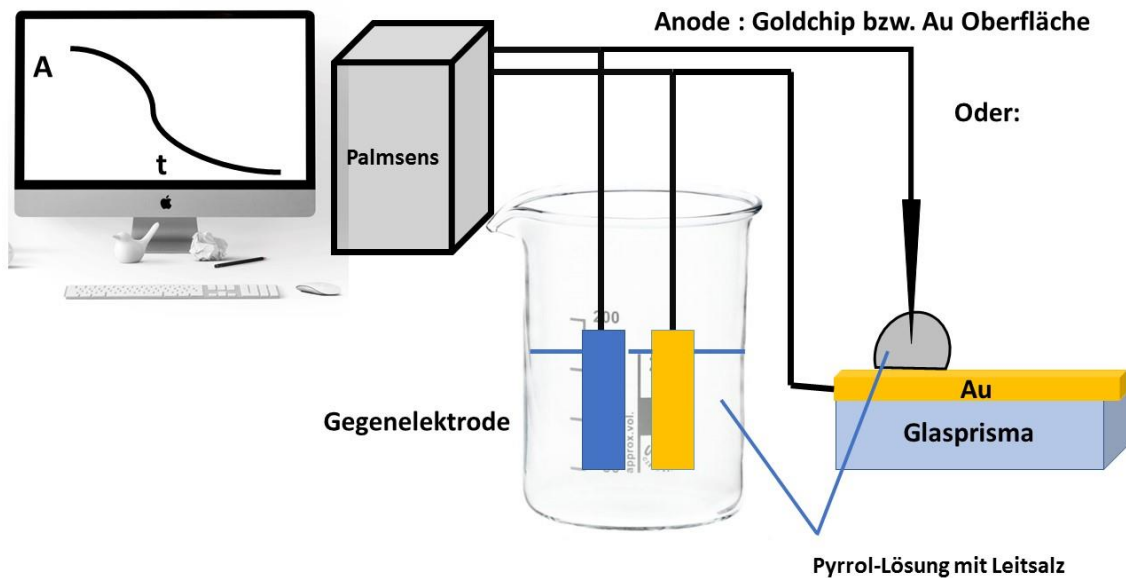


Abbildung 61: Theoretischer Aufbau einer verbesserten Elektropolymerisationsanlage.

Zwar zeigten die mit PPy beschichteten Prismen, was die Oberfläche betrifft, eine sehr hohe Stabilität, jedoch war dies auch ein Nachteil, da die Prismen durch die bereits beschriebene Reinigungsprozedur mittels $\text{KOH}/\text{H}_2\text{O}_2$ nicht wieder zu regenerieren waren.

Des Weiteren kostete die Vorbereitung der Elektropolymerisation relativ viel Zeit. Dies sollte bei den weiteren Oberflächen-Modifikationen nicht der Fall sein, weshalb folgende vier Punkte berücksichtigt wurden:

1. Einfache und schnelle Schichtbildung
2. Möglichst im SPR-Gerät (Echtzeit-Überwachung der Schichtbildung)
3. Vielseitige Oberfläche
4. Oberflächenmodifikation durch Reinigung entfernbar (Regenerierbarkeit).

5.7.2 Entwicklung von BSA-Goldnanopartikel-Sandwich-Oberflächen

Die Verwendung von „BSA als Plattform“ bzw. untere Schicht für weitere gezielte Veränderung und Funktionalisierung mittels Goldnanopartikeln gelang; auch die darauffolgende adsorptive Bindung von Antikörpern an AuNP's konnte durchgeführt werden. Es konnte durch Variation der Puffer ein Aggregieren der Nanopartikel bei Kontakt mit der BSA-Oberfläche vermieden werden. Auch weiterführende Bindungsstudien verliefen wie erwünscht. Jedoch sollte die Oberfläche hinsichtlich der Flächendeckung der Nanopartikel weiter untersucht werden, um mögliche, negative Wechselwirkungen von Analyten mit der BSA-Oberfläche weitestgehend auszuschließen. Die Daten der Oberflächenbelegung der Nanopartikel könnten direkten Aufschluss über benötigte Mengen / Konzentrationen von z.B. „Fängerantikörpern“ liefern und somit einen effizienteren und empfindlicheren Assay liefern.

Einschränkungen dieses Setups sind trotz der überragenden Vielseitigkeit vorhanden. So lassen sich Puffer nur bedingt frei wählen, da hohe Ionenstärken von Pufferlösungen schnell zu einer Agglomeration der Nanopartikel führen. Somit können Proteine, welche nur unter „Hochsalzbedingungen“ stabil sind, nicht in einem BSA-AuNP basierenden Assay bzw. nur mit Einschränkungen verwendet werden.

5.7.3 Entwicklung von BSA-Goldnanopartikel-Sandwich-Oberflächen

Der letzte Ansatz, der während der Promotionsarbeit zu einer schnellen und gezielten Oberflächenmodifikation entwickelt wurde, waren funktionalisierte Zucker, welche durch ihre hohe chemische Stabilität sowie ihrer vielseitigen Modifizierbarkeit ein besonders großes Spektrum an verschiedenen Assay-Formaten abdecken sollten. Hierbei gibt es nur geringe Einschränkungen, wobei die Oxidationsempfindlichkeit der freien Thiolgruppen nicht unerwähnt bleiben sollte, was eine Lagerung bei niedrigen Temperaturen unter Luftausschluss nötig macht. Die Ergebnisse der Bindungsstudien zeigten keinerlei Vorteil für einen der verschiedenen getesteten Zucker, weshalb hierfür das ökonomisch vorteilhafteste Polysaccharid für weitere Studien gewählt werden sollte. Da Arabino-galactan halb feste, klebrige Produkte nach der Carboxymethylierung liefert, mit denen nur schwer gearbeitet werden kann, könnte auf eine weitere Verwendung dieses Polysaccharides wohl verzichtet werden. Inulin ist aufgrund seiner geringen Größe und Komplexität der aussichtsreichste Kandidat für weitere Entwicklungen. Hierbei kann theoretisch

durch NMR-Analytik der Substitutionsgrad oder eventuell die zuvor kovalent gebundenen Wirkstoffe oder Strukturen charakterisiert werden.

6 Zusammenfassung und Fazit

Die nachfolgenden, abschließenden Kapitel der Arbeit umfassen vorerst die synthetischen Arbeiten und die hierdurch erlangten Ergebnisse. Das nächste Unterkapitel fasst die Erkenntnisse der Naturstoffextraktion und deren Analytik zusammen. Abschließend wird eine Übersicht der Entwicklungen für biosensorische Anwendungen (SPR) in zusammengefasster Form vorgestellt.

6.1 Zusammenfassung Synthese und Reaktivität von Thiocyanaten und Disulfiden

Während der Arbeit konnte die korrekte Struktur des roten Farbstoffs durch Kristallisation und Kristallographie endgültig geklärt werden. Es wurde eine Synthese, ausgehend von leicht zugänglichem 2-Thiocyanatopyrrol, etabliert. Bei der Entwicklung der Synthese ist zudem eine neue Art der Reaktion von Pyrrol- und Indol-Thiocyanaten entdeckt und ein möglicher Mechanismus postuliert worden, wobei eine „pseudo Riemschneiderreaktion“ Thioimidsäureester liefert; sowie eine vermutete Weiterreaktion dieser Produkte, die in alkoholischen Lösungsmitteln letztendlich zu Thioethern führt.

6.1.1 Substitution des roten Farbstoffs

Es konnte herausgefunden werden, dass die Substitution des roten Farbstoffs nur sehr schwierig zu erreichen ist und dabei sehr viele Nebenprodukte entstehen (Abb. 62).

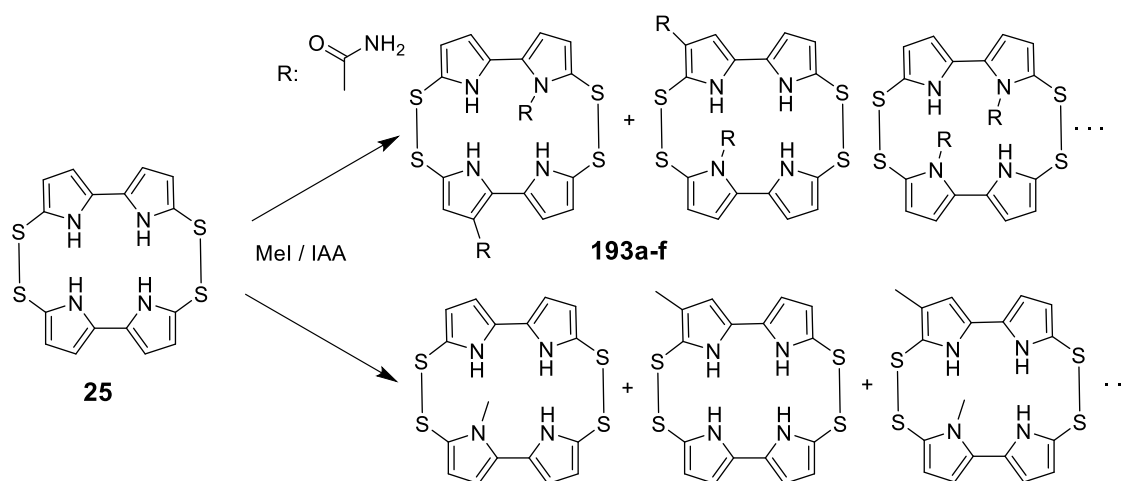


Abbildung 62: Potentielle Reaktionen bei der Substitution des Tetrathiaporphyrins.

Der wohl schwerwiegendste Grund hierfür ist, dass beim Einsatz reaktiver Elektrophile nicht nur der Stickstoff der Biyrroleinheiten substituiert werden kann, sondern auch zusätzlich dazu die Aromaten selbst. Ein weiterer Grund, weshalb diese Methode zur Klärung der endgültigen Struktur verworfen wurde und nur Hinweise lieferte, war, dass die einzelnen, in sehr geringen Mengen erhaltenen Reaktionsprodukte, die nach Derivatisierung noch instabiler waren als die Ausgangsverbindung selbst.

6.1.2 Syntheserouten ausgehend von Disulfiden und Thiocyanaten

Die Synthese eines alternativen roten Farbstoffes, ausgehend von der Annahme, dass es sich hierbei lediglich um ein, wie zuvor publiziert, „Dipyrrolverbindung“ handelt, erwies sich als nicht durchführbar. Vor allem bromierte oder iodierte Pyrrolverbindungen, aber auch Disulfide für die intramolekulare Aryl-Aryl-Kupplung zeigten eine hohe Instabilität. Die verwendeten Pyrrol-Disulfide waren zudem zu einem großen Teil schwierig darzustellen, neigten stark zu Polymerisation sowie zur Oxidation.

Ausnahme hierbei war das N-Tosylpyrroldisulfid, welches, ausgehend von Schwefelmonochlorid und Tosylpyrrol, zugänglich war. Jedoch war diese Verbindung zu stabil und zeigte nur unter Verwendung sehr starker Oxidationsmittel überhaupt eine Reaktion, welche leider nicht zu den gewünschten Produkten führte. Mit den verschiedenen eingesetzten Oxidationsmitteln konnten die anderen, reaktiveren Disulfid-Verbindungen nicht glatt zu den jeweiligen Thiosulfinsäureestern bzw. zu isolierbaren farbigen Folgeprodukten reagieren; oder aber sie zeigten keinerlei Bestrebung, unter Kondensation zu cyclisieren.

Somit konnten bei diesen Versuchen keinerlei Dithiine oder auch Tetrathiaporphyrine isoliert werden.

Es kann nicht zweifelsfrei angenommen werden, dass die Bildung von Dithiinen aus Thiosulfinaten in wasserfreien organischen Lösungsmitteln ablaufen kann. So wurde im Falle der oben dargestellten Reaktionen Dichlormethan als Lösungs- und MCPBA als Oxidationsmittel verwendet. Für alle durchgeführten Reaktionen dieses Typs konnten keinerlei farbige Reaktionsprodukte beobachtet werden. Ein Grund hierfür könnte die Absenz einer Koordination der Thiosulfinate durch protische Lösungsmittel sein oder ein Mangel an Protonenakzeptoren in der Lösung.

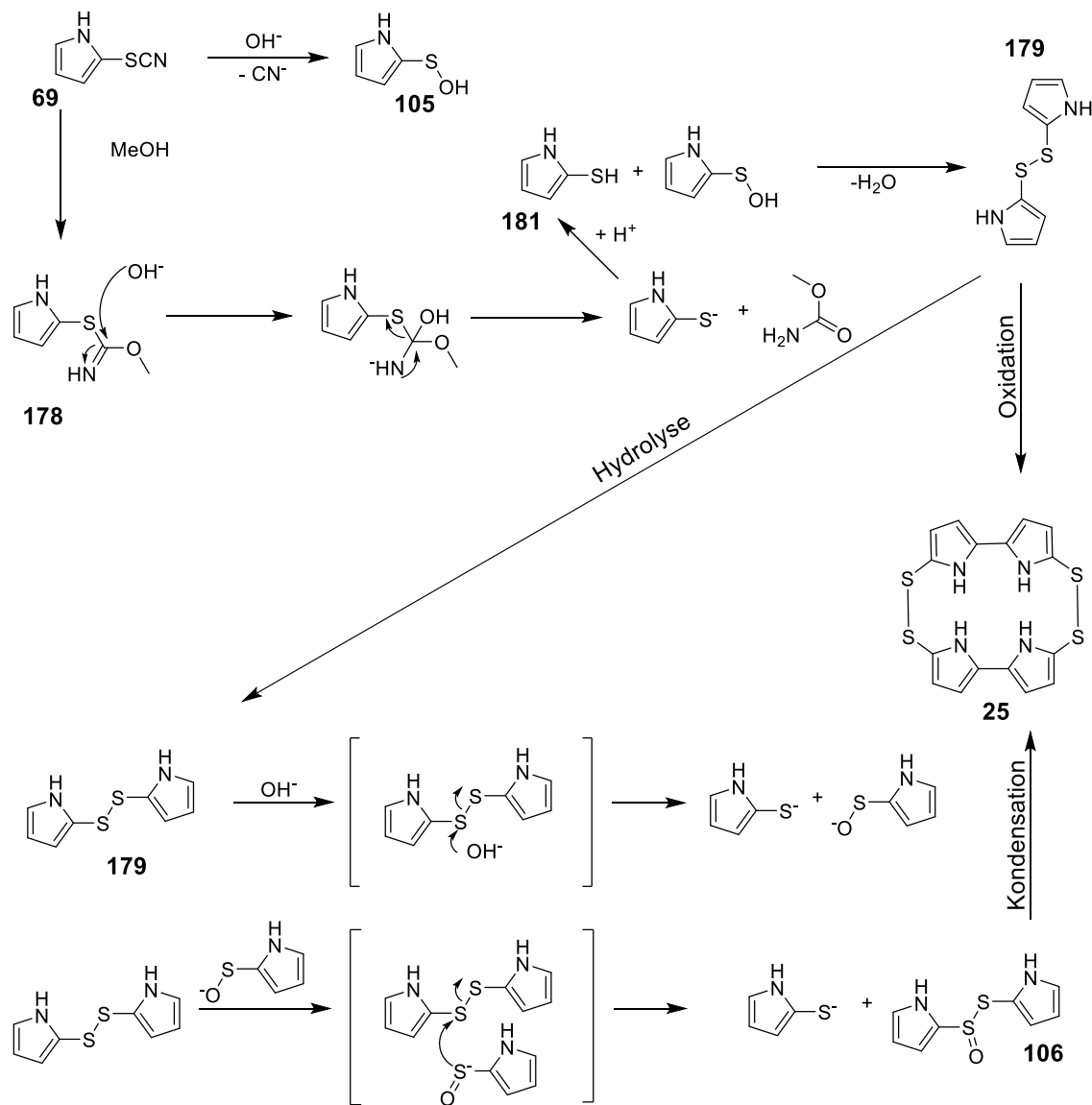
Hierbei scheint für die Bildung eines Bisdisulfids die freie unsubstituierte NH-Gruppe des Pyrrols eine besondere Rolle zu spielen, weil bei keinem der verwendeten N-substituierten Pyrrolthiocyanaten eine entsprechende, porphyrinartige Struktur isoliert werden konnte. Jedoch konnte bei einigen dieser Reaktionen das Auftreten einer starken Blau- bis Grünfärbung beobachtet werden. Diese Verbindungen könnten die respektiven analogen Bisdisulfide darstellen; jedoch sind diese nur unter absolutem Luftausschluss für kurze Zeit (~ 4 Stunden) stabil und oxidieren während der Aufarbeitung an der Luft zu farblosen Folgeprodukten binnen kürzester Zeit. Da die Bildung eines Tetrathiaporphyrins nur aus 2-Thiocyanatopyrrol selbst und nicht aus verschiedenen N-substituierten Thiocyanatopyrrolen zu erreichen war, lässt sich sowohl eine Abhängigkeit von der N-H-Azidität als auch vom sterischen Anspruch der Substituenten und die Möglichkeit der Wasserstoffbrückenbildung diskutieren. Auch das als Base zugegebene Natriumhydroxyd könnte als Aktivator für die C-C Bindungsknüpfung fungieren. Durch eine N-Deprotonierung des 2-Thiocyanatopyrrols bzw. der Folgeprodukte würde eine sehr reaktive Spezies entstehen, welche unter Kondensation C-C-Bindungen knüpfen kann.

Hinsichtlich dieses Mechanismus sollte durch Umsetzung von verschiedenen 3,4-disubstituierten Pyrrolen abschließend geklärt werden, ob sich RF-Analoga aus solchen Edukten bilden können.

Dieser Reaktionstyp lieferte, ausgehend von 2-Thiocyanatopyrrol, letztendlich das erwünschte Produkt, den roten Farbstoff. Man kann hierbei von einer biomimetischen Synthese sprechen, da unter Nutzung der vielseitigen Redoxchemie der Schwefelverbindungen über Umwege das Reaktionsprodukt der Allinase *in situ*, also während der Reaktion, gebildet wird. Das entstandene Pyrrolthiosulfinat reagiert unter den gewählten Bedingungen mit einem zweiten Äquivalent Thiosulfinat zu dem roten Farbstoff. Alternativ erlaubt

die Synthese einen Nebenreaktionspfad, der unter Nutzung von Luft-Sauerstoff als Oxidationsmittel und Pyrroldisulfid entweder direkt oder über das Thiosulfinat das gewünschte Produkt liefert.

Ein möglicher Mechanismus, ausgehend von den für die Synthese des roten Farbstoffes eingesetzten Thiocyanaten, ist in Schema 38 dargestellt. Hierbei bildet sich über mehrere Schritte zunächst eine reaktive Disulfid-Spezies, welche durch Oxidation schließlich zum Endprodukt abreagiert.



Schema 38: Bildung des roten Farbstoffes aus Pyrrolthiocyanat.

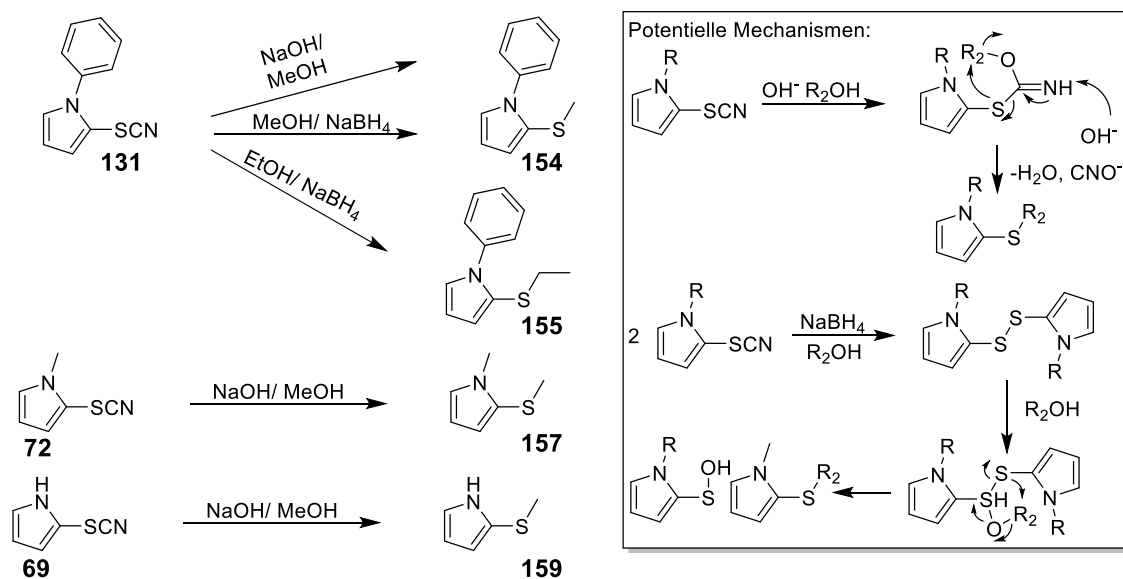
Der Reaktionspfad wäre in diesem Falle, ab der Bildung des Disulfides, identisch. Jedoch ist es wahrscheinlich, dass sich der Oxidationsschritt unterscheidet. Im Falle der Synthese ist hierbei Luftsauerstoff das Oxidationsmittel bzw. Schwefel, der während der Reaktion disproportioniert; jedoch können bei den Reaktionen der Pflanze auch andere Verbindungen oder enzymkatalysierte Prozesse die Rolle des Oxidationsmittels übernehmen.

Das Edukt des roten Farbstoffes 2-Pyrrolylcysteinsulfoxid ist Gegenstand andauernder Forschung des Arbeitskreises. Mögliche Methoden zu seiner Darstellung sind in dieser Arbeit nicht verfolgt worden; jedoch sind Pyrrolthiocyanate eine vielversprechende Ausgangsverbindung für mögliche Synthesen. Auch das zuvor postuliert 3-Pyrrolylcysteinsulfoxid wäre synthetisch einfach aus 2-Pyrrolylcysteinsulfoxid über Umlagerung zugänglich.^[135]

Hinter dieser Eigenschaft wird auch die biologische Aktivität vermutet. So könnte es sein, dass durch diesen Polymerfilm, der sich nach Verletzung bildet, die Wunde verschlossen wird oder diese Schicht bakterizide oder fungizide Eigenschaften besitzt. Andere Tetra-thiaverbindungen, wie beispielsweise das Bisindoltetrasulfid, weisen eine starke fungizide sowie bakterizide Wirkung auf. Somit könnte auch die hier erforschte Verbindung ähnliche Wirkeigenschaften aufweisen. Zusätzlich zu dieser Erklärung könnte der polymere Film stark Kationen-koordinierende Eigenschaften besitzen, welche zu einer antibiotischen Eigenschaft beitragen könnten. Weitere Wirkmodi sind aber durchaus möglich.

6.1.2 Neuartige Reaktionen von Thiocyanaten

Eine interessante Reaktion wurde unterdessen bei verschiedenen Umsetzungen von Thiocyanaten sowohl mit hydroxidhaltigen Lösungsmitteln als auch bei der Reduktion mittels NaBH_4 beobachtet. Diese nur in Ansätzen literaturbekannte Reaktion liefert, ausgehend von Thiocyanaten, verschiedene Thioether sowie Disulfide, wobei der eingeführte Alkylrest vom eingesetzten Lösungsmittel stammt (Schema. 39). Die Reaktion verlief besonders gut bei N-Phenyl-2-thiocyanatopyrrol, bzw. die Produkte zeigten hier die höchste Stabilität. Einzig bei N-Phenyl-2-thiocyanatopyrrol konnte auch eine Substanz isoliert werden die vorläufig und in gutem Einklang mit den erhaltenen analytischen Daten als N-Phenylpyrrolidisulfid bezeichnet wird.



Schema 39: Bildung von Thioethern aus Thiocyanaten.

Diese Mechanismen würden erklären, dass sowohl bei der Reduktion der Thiocyanate als auch bei einer alkalischen Hydrolyse Thioether entstehen, welche bei der Synthese des roten Farbstoffs als Nebenprodukte anfallen. Ausgehend davon, ergab sich eine Testreaktion, bei der leicht (kommerziell) zugängliche Disulfide in alkalischer Alkohollösung sich zu den jeweiligen Thioethern umsetzen lassen sollten (Thienyldisulfid sowie Benzyldisulfid). Hierbei zeigte Thienyldisulfid die zu erwartende Disproportionierung zu der entsprechenden Sulfin- sowie Sulfonsäure, die massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnten. Benzyldisulfid hingegen zeigte nur eine sehr geringe Umsetzung unter den gewählten Bedingungen. Es ist wahrscheinlich, dass nur stark elektronenreiche, aromatische Disulfide die neuartige Reaktion zur Bildung von Thioethern eingehen. Es ist auch anzunehmen, dass auch die Bildung von cyclischen Bisdisulfiden stark von der Reaktivität der jeweiligen 2-Thiocyanatopyrrolen abhängt.

Bei allen getesteten Pyrrolthiocyanaten konnten die entsprechenden Thioether isoliert und charakterisiert werden. Von besonderem Interesse ist die Synthese im Falle von 2-Alkythiopyrrolen, da diese nicht durch die Umsetzung der Thiocyanate mit Alkylhalogeniden erzeugt werden können, denn bei der Umsetzung dieser Verbindungen, in basischem Milieu, würden hauptsächlich die N-alkylierten Produkte entstehen.

6.2 Analytik und Extraktion von schwefelhaltigen Verbindungen aus *Allium*-Spezies

Durch die Vielzahl an natürlichen Proben in den vorhandenen Substanzen, können durch „unspezifische“ Matrixeffekte oder durch spezifische Wechselwirkungen mit einem im Extrakt befindlichen Stoffen die Trennungen stark erschwert werden. Vor allem die in *Allium*-Spezies vorhandenen Fructane erschwerten die Reinigung der polaren Pyrrol-Schwefelverbindungen. Die Anwesenheit hoher Konzentrationen von anorganischen Salzen hingegen führte zu einer raschen Zersetzung der Proben, weshalb Methoden entwickelt wurden, möglichst salzarme und Polysaccharid-freie Extrakte zu erhalten.

6.2.1 Analytik und Extraktion der vermuteten Lactylpyrrolsulfoxid

Das Extraktionsverfahren des Zwiebel-Lyophilisates konnte optimiert werden, so dass entweder relativ reiner roter Farbstoff (in Isopropanol) oder das vermutete Lactyl-PSO (MeOH/H₂O) erhalten werden konnten.

Die zuvor nicht etablierte Methode zur Isolation des reinen Lactyl-PSO wurde durch Verwendung von Ionenaustausch-Chromatographie in Verbindung mit „normal Phase“ Amino-Phasen – HPLC erarbeitet. Hierbei wurde festgestellt, dass die Vielzahl von in den Extrakten befindlichen Sacchariden die Trennung erschweren und die Reinsubstanz nur durch mehrere aufeinanderfolgende Chromatographie-Schritte in ausreichender Reinheit gewonnen werden kann. Hierbei muss, um eine ausreichende Menge der gewünschten Verbindung zu erhalten, mit Massen um 200 – 500 g an entsprechendem *Allium* Lyophilisat gearbeitet werden.

6.2.2 Analytik und Extraktion des roten Farbstoffs

Die säulenchromatographische Reinigung der Extrakte zur Isolation des roten Farbstoffs konnte soweit optimiert werden, dass Kristallisationsversuche unternommen werden konnten. Mittels Röntgenkristallographie konnte letztendlich die korrekte Struktur der Verbindung geklärt werden (Abb. 63).

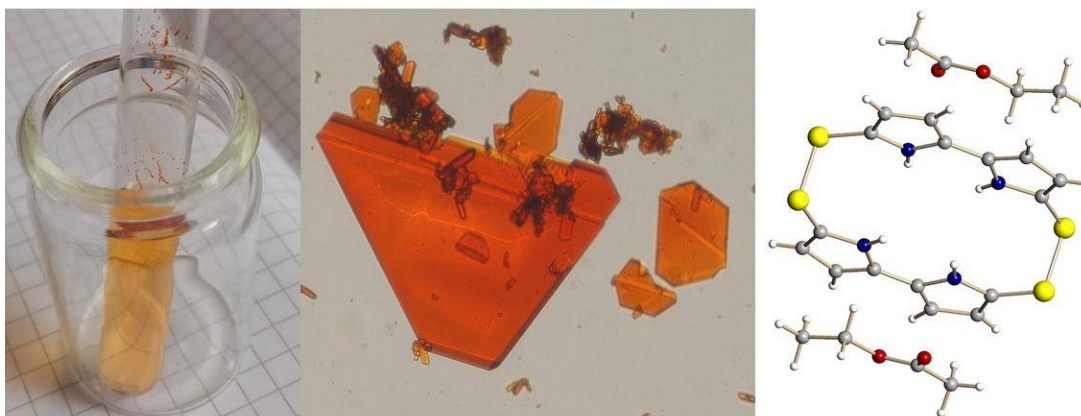


Abbildung 63: Entwicklungsstufen des Kristallisationsexperiments: links: erste Versuche zur Kristallisation, mitte: optimierte Kristallisation mit großen Kristallen; rechts: finale Kristallstruktur.

Dies galt sowohl für die aus Pflanzenproben extrahierte als auch für die synthetisch hergestellte Verbindung. Das Extraktionsverfahren wurde insofern optimiert, dass polare Pyrrol-Schwefelverbindungen und weniger polare Verbindungen, wie der rote Farbstoff, getrennt voneinander in zwei Schritten isoliert werden können. Somit wurde Pflanzenmaterial wesentlich effizienter genutzt, weil bei der Aufarbeitung der jeweiligen Verbindung die andere durch Wechselwirkung mit den Säulenmaterialien verloren ging.

6.3 Entwicklung von Oberflächen für die SPR-Biosensorik

Es konnten drei verschiedene Methoden zur Oberflächenmodifikation für biosensorische Anwendungen entwickelt werden, wobei alle Methoden vielseitig verwendbar und für verschiedenste Plattformen adaptierbar sind. Die Tests, die mittels SPR durchgeführt wurden, zeigten die mögliche Immobilisierung von Analyten entweder durch hydrophobe Wechselwirkungen, kovalente Bindung mittels EDC/NHS, Wasserstoffbrücken, Zucker-Lektinwechselwirkung oder Adsorption an Nanopartikel (Abb. 64).

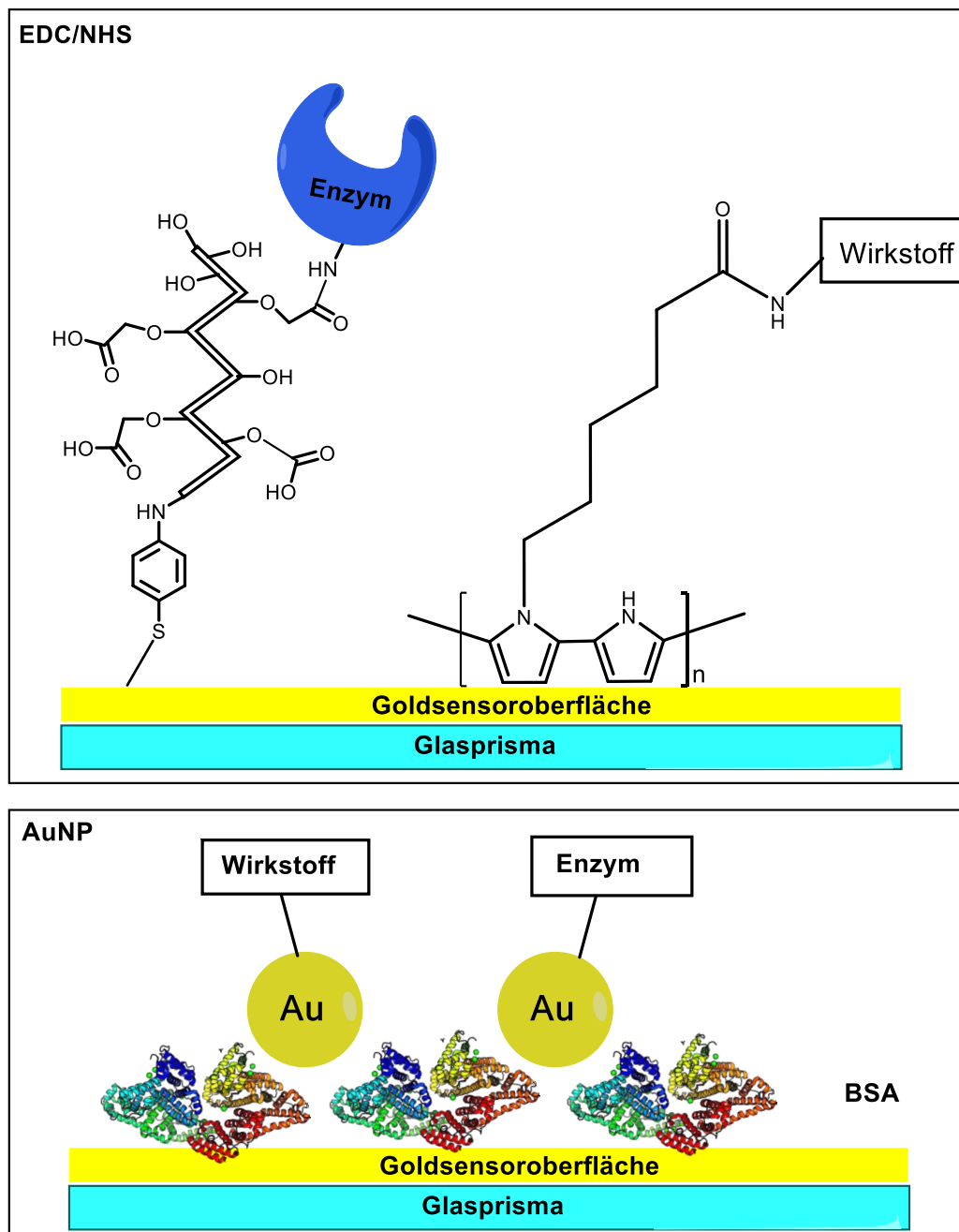


Abbildung 64: Beispiele für mögliche Immobilisierung von Verbindungen auf Oberflächen durch EDC/NHS oder adsorptive Methoden.

6.3.1 Entwicklung von Polypyrrol-Oberflächen für die Biosensorik

Für Oberflächen, die durch die Elektropolymerisation von verschiedenen Pyrrolmonomeren erzeugt wurden, zeigte sich eine hohe chemische und mechanische Stabilität sowie die Möglichkeit, Polysaccharide, wie Mannan, sowohl auf polar modifizierten als auch auf unpolar modifizierten Oberflächen zu immobilisieren. Die sukzessive Bindung eines Fusionsproteins aus ConA und Sav (Concanavalin A und Streptavidin) war erfolgreich. Diese Methode kann somit sowohl für die Kovalente Bindung mittels EDC/NHS Carbonsäure haltigen Polypyrrolen verwendet werden, als auch durch Immobilisierung von Verbindungen die biotinyliert wurden. Die relativ geringen Bindungsraten bei Carbonsäure haltigen Polypyrrolen, hinsichtlich Mannan, lassen auf eine recht geordnete dünne Schicht rückschließen.

6.3.2 Entwicklung von BSA-AuNP-Oberflächen für die Biosensorik

Die Funktion von BSA als untere Schicht für weitere Funktionalisierung mit Goldnanopartikeln konnte erfolgreich etabliert werden. Erste Bindungsstudien mittels Antikörpern, die direkt adsorptiv immobilisiert, verliefen auch im Bereich sehr geringer Konzentrationen der Antikörper zufriedenstellend. Weitere Studien mit weiteren Proteinen, also als untere Schicht zur Optimierung der AuNP-Bindungsrate, könnten dabei noch sensitivere Assays liefern.

6.3.3 Entwicklung von Polysaccharid-Oberflächen für die Biosensorik

Die Modifikation mittels Polysacchariden ist aufgrund der im SPR-Gerät durchführbaren Oberflächenmodifikation und der kürzeren Zeiten bis zu einer funktionellen Oberfläche für schnelle Analysen sowie für erste Tests von Vorteil. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Pullulan, Dextran, Inulin und Arabinogalactan für die Biosensorik bzw. für die Generierung von Hydrogel-artigen Oberflächen verwendet werden können. Zudem sind für alle verschiedenen MA-CM-Saccharide Bindungen sowohl über ConA-Sav als auch durch kovalente Immobilisierungsstrategien möglich. Die erhaltenen Ergebnisse suggerieren, dass die Größe und die Verzweigungsrate der Polysaccharide sowie die Carboxymethylierung für die Bindung von Lektinen von untergeordneter Bedeutung ist. Auch konnte anhand der Bindungsraten nicht zwischen den einzelnen MA-CM-Sacchariden

differenziert werden, obwohl die Massen bzw. Kettenlängen sich zum Teil stark unterscheiden (Inulin / Pullulan). Somit konnte postuliert werden, dass sich im Bereich der Goldoberfläche eine „konservierte“ Struktur bildet, wobei die Polysaccharidstrukturen sich nicht linear nach oben, sondern sich vermutlich eher wenig strukturiert auf der Oberfläche anordnen.

Weitere Optimierungsarbeiten der einzelnen Methoden zur Oberflächenimmobilisierung sind in allen drei Fällen möglich und, gerade hinsichtlich einer Weiterentwicklung biosensorischer-Methoden, sinnvoll.

6.4 Ausblick

- Vielversprechende Synthesen, die sich aus den Versuchen ableiten lassen.
- Umbau des SPR-Gerätes, so dass Elektropolymerisation im Gerät möglich ist
- Untersuchung der Bioaktivität der RF-Polymers
- Generierung neuartiger (Wirk-)Stoffbibliotheken mittels Alliinasereaktion

7 Abstract

With over 850 species, the genus *Allium* is one of the most prominent genera. Especially in the subgenus *Melanocrommyum*, numerous exciting compounds have been isolated. For example, noteworthy concentrations of pyridinyl-N-oxides were found in *A. stipitatum*; marasmin, known chiefly from South African *Tulbaghia* species, was found in *A. suworowii*. The aim of this work was the characterization of a red pigment produced by some species of the *Melanocrommyum* subgenus, upon tissue damage from allinase reaction of pyrrole-2-cysteine sulfoxide. Although two publications describe the structure and potential substrates, because of prior results of the Keusgen group, doubts have arisen concerning the correctness of both structures. The second target was the synthesis of this compound, along with biosensor measurements, to determine the response upon treatment with oxidation agents and subsequent polymerization. The third component of the research, conducted during the Ph.D. thesis, was the development of novel surface modification procedures inspired by the genus *Allium*, or, more precisely, its several natural products like fructans and pyrrole compounds.

Crystallization experiments showed that the previously published structures for the red pigment are not correct. It was confirmed that chemical structure contains four pyrrole moieties forming two bipyrrrole units connected by disulfide bridges. Thus, the substance is closely related to porphyrins but shows a distinct step-like structure. A simple one-pot synthesis for the target molecule, involving easily to prepare educts, was developed. Alkaline hydrolysis of 2-thiocyanato-pyrrole was used to create a biomimetic synthesis yielding pyrrolyl-2-thiosulfinato-pyrrole in low concentrations, finally leading to the red pigment after several condensation steps. A novel reaction concerning several 2-thiocyanato-pyrroles was discovered during the optimization of the red pigment synthesis. It was shown that after hydrolysis of three different thiocyanato-pyrroles in alcoholic solvents, the S-alkylated products could be isolated in acceptable yields. This reaction poses an alternative approach to non-N-substituted pyrrole thioethers. Another unusual reaction occurred during these investigations, which was called a pseudo-Riemschneider-reaction. For all substrates that were hydrolyzed in alkaline alcoholic solvents, carbonimido-thioates were produced. The reaction proceeded with ethanol and methanol as solvents, which cannot be used in the Riemschneider reaction. In contrast to the former reaction, only secondary and tertiary alcohols tend to react under acidic conditions.

Inspired by the tendency of pyrrole compounds to polymerize, a novel surface modification, involving N-substituted-pyrrole/pyrrole copolymers was developed. Surface-Plasmon-Resonance-(SPR)-studies conducted with these surfaces did show a high degree of compatibility with existing protocols. EDC/NHS- activation and covalent immobilization of biomolecules were possible due to the versatility of this method. Another trait of the copolymers was the excellent binding affinity for polysaccharides like mannan. Polar- (carbonic acid) and unipolar- modified copolymers allowed the binding of mannan: the subsequent immobilization and use of the fusion protein ConA-Sav, which was established in the Keusgen group, was one of the primary targets and showed good results. A regeneration of the surface using a complimentary monosaccharide (α -D-methyl-mannopyranoside) was unfortunately only partially possible.

The second method for biosensing SPR-surfaces was developed using the natural affinity of bovine serum albumin (BSA) to gold substrates, which led to a gold/BSA/gold nanoparticle-sandwich-platform. Tests, using an antibody bound adsorptively to the surface of the nanoparticles, did show high performance. The measurements were reproducible concerning the binding rates of BSA and gold nanoparticles; the binding-event of anti-BSA showed a linear relationship of binding rate and concentration between 15 μ g/mL and 30 μ g/mL.

Lastly, a polysaccharide-based surface modification was established using some broadly available polysaccharides: inulin, dextran, arabinogalactan, and pullulan. The saccharides were successfully carboxymethylated and modified with 4-mercapto aniline to allow simple modification of gold-SPR-chips. The binding rates of the different modified glycans were evaluated using the SPR-technique. They produced highly similar results, regardless of the average weight of the glycans, suggesting a horizontal instead of a vertical binding of such poly sugars. The layers did show a high affinity for the ConA-Sav fusion protein and allowed EDC/NHS procedure to immobilize e.g., BSA, and anti-BSA binding confirmed successful immobilization. Although this strategy using modified glycans did provide satisfying results; more research is ongoing to develop a spacer between the gold surface and the polysaccharides. This improvement aims to address the problems with the similar film-formation during the first polysaccharide immobilization step. Furthermore, the development aims to provide glycan or hydrogel surface in a much more reasonable period compared to literature methods that need several days to be accomplished.

Keywords: Pyrrole chemistry, polypyrrole, disulfides, organic thiocyanates, alkylthiopyrrole synthesis, electropolymerization, small molecule SPR, biosensors, surface modification, polysaccharides, gold nanoparticles.

Deutscher Abstract:

Mit über 850 Arten ist die Gattung *Allium* eine der bekanntesten Gattungen. Insbesondere in der Untergattung *Melanocrommyum* wurden zahlreiche interessante Verbindungen isoliert. So wurde in *A. stipitatum* Pyridinyl-*N*-oxide gefunden; Marasmin, hauptsächlich aus südafrikanischen *Tulbaghia*-Arten bekannt, wurde aus *A. suworowii* isoliert. Das Hauptziel dieser Arbeit war die Charakterisierung eines roten Pigments, dass von einigen Arten der Untergattung *Melanocrommyum* bei Gewebeschäden, durch Alliinasereaktion von Pyrrol-2-cysteinsulfoxid, gebildet wurde. Obwohl zwei Veröffentlichungen die Struktur und mögliche Substrate beschreiben, sind aufgrund früherer Ergebnisse des Arbeitskreis Keusgen konkrete Zweifel an der Korrektheit beider Strukturen aufgekommen. Das zweite Ziel war die Synthese dieser Verbindung sowie biosensorischer Messungen, um die Verbindung hinsichtlich ihrer Oxidationsempfindlichkeit und Polymerisationsneigung zu charakterisieren. Die dritte Komponente der Forschungsarbeit, die während der Promotion durchgeführt wurde, war die Entwicklung neuartiger Oberflächenmodifizierungsverfahren. Diese wurde hierbei stark durch die Gattung *Allium*, beziehungsweise die darin vorkommenden Naturstoffe wie Fructane und Pyrrolverbindungen, inspiriert.

Kristallisationsexperimente des roten Farbstoffs zeigten, dass die zuvor veröffentlichten Strukturen nicht korrekt waren. Es wurde bestätigt, dass die Struktur vier „Pyrroleinheiten“ enthält, welche zwei Bipyrrroleinheiten bilden, die ihrerseits durch Disulfidbrücken verbunden sind. Für das Zielmolekül wurde eine einfache Eintopfsynthese entwickelt, für die die Edukte gut zugänglich sind. Durch alkalische Hydrolyse und Disproportionierung von 2-Thiocyanatopyrrol wurde (biomimetisch) das Pyrrolyl-2-thiosulfonatopyrrol in geringen Konzentrationen gebildet, das nach mehreren Kondensationsschritten zum roten Farbstoff führte. Bei der Optimierung der Syntheseroute wurde eine neuartige Reaktion mehrerer 2-Thiocyanatopyrrole entdeckt. Es konnte gezeigt werden, dass durch Hydrolyse drei verschiedener Thiocyanatopyrrole in alkoholischen Lösungsmitteln die S-alkylierten Produkte in akzeptablen Ausbeuten isolieren lassen. Bei diesen Untersuchungen fiel eine weitere ungewöhnliche Reaktion auf, die als Pseudo-Riemschneider-Reaktion bezeichnet wurde. Für alle Substrate, die in alkalischen, alkoholischen Lösungsmitteln hydrolysiert wurden, konnten auch Carbonimidothioate nachgewiesen werden. Diese Reaktion verlief auch mit Ethanol und Methanol als Lösungsmittel, die bei der „klassischen“ Riemschneider-Reaktion nicht reagieren. Bei dieser, im sauren Milieu durgeführten Reaktion, können nur sekundäre und tertiäre Alkohole umgesetzt werden.

Die Polymerisationsneigung von Pyrrolverbindungen führte zur einer Oberflächenmodifizierung mittels *N*-substituierten-Pyrrol / Pyrrol-Copolymeren. Oberflächen-Plasmon-Resonance- (SPR) –Studien dieser Oberflächen, zeigten einen hohen Grad an Kompatibilität mit bestehenden Protokollen. EDC / NHS-Aktivierung und kovalente Immobilisierung von Biomolekülen sowie adsorptive Methoden waren aufgrund der Vielseitigkeit dieser Methode möglich. Ein weiteres Merkmal der Copolymere war die hervorragende Bindungsaffinität für Polysaccharide wie Mannan. Die anschließende Immobilisierung unter Verwendung des in der Keusgen-Gruppe etablierten Fusionsproteins ConA-Sav, lieferte gute Bindungsraten. Eine Regeneration der Oberfläche unter Verwendung eines komplementären Monosaccharids (α -D-Methylmannopyranosid) war leider nur teilweise möglich.

Die zweite Methode zur Darstellung neuartiger Oberflächen für biosensorische Anwendungen wurde unter Nutzung der natürlichen Affinität von BSA ((Rinderserumalbumin (BSA))) zu Goldsubstraten entwickelt, was zu einer Gold / BSA / Gold-Nanopartikel- (AuNP) Sandwich-Plattform führte. Tests unter Verwendung eines Antikörpers, der adsorptiv an die Oberfläche der Nanopartikel gebunden wurde, zeigten eine hohe *Performance*. Die Messungen waren hinsichtlich der Bindungsraten sowohl von BSA als auch Goldnanopartikeln reproduzierbar; Für die Anti-BSA-Deposition auf AuNP wurde ein linearer Zusammenhang zwischen Bindungsrate und Konzentration zwischen 15 $\mu\text{g} / \text{ml}$ und 30 $\mu\text{g} / \text{ml}$ erhalten.

Schließlich wurde eine auf Polysacchariden basierende Oberflächenmodifikation unter Verwendung einiger allgemein verfügbarer Polysaccharide hergestellt: Inulin, Dextran, Arabinogalactan und Pullulan. Die Bindungsraten der verschiedenen modifizierten Glykane (Mercaptoanilin und Carboxymethyl modifiziert) wurden unter Verwendung der SPR bewertet. Sie ergaben unabhängig vom Durchschnittsgewicht der Glykane sehr ähnliche Ergebnisse, was auf eine horizontale statt einer vertikalen Bindung solcher Polyzucker schließen lässt. Die Schichten zeigten eine hohe Affinität für das ConA-Sav-Fusionsprotein und ermöglichten es dem EDC / NHS-Verfahren, beispielsweise BSA, zu immobilisieren und die Anti-BSA-Bindung bestätigte die erfolgreiche Immobilisierung. Obwohl diese Strategie unter Verwendung von modifizierten Glykanen zufriedenstellende Ergebnisse lieferte; sind weitere Forschungen zur Entwicklung eines *Spacers* zwischen Goldoberfläche und den Polysacchariden Bestandteil aktueller Forschung.

8 Literaturverzeichnis

- [1] R. Kamenetsky, H. D. Rabinowitch, *Horticultural Reviews* **2006**, 32, 329.
- [2] a) H. Xiao, K. L. Parkin, *Journal of agricultural and food chemistry* **2002**, 50, 2488; b) M. Keusgen, R. M. Fritsch, H. Hisoriev, P. A. Kurbonova, F. O. Khassanov, *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* **2006**, 2, 18; c) P. K. Lai, J. Roy, *Current medicinal chemistry* **2004**, 11, 1451; d) D. C. Maidment, Z. Dembny, Di Watts, *Nutrition & Food Science* **2001**, 31, 238; e) C. G. Sheela, K. Kumud, K. T. Augusti, *Planta Medica* **1995**, 61, 356; f) P. Kaiser, M. S. Yousouf, S. A. Tasduq, S. Singh, S. C. Sharma, G. D. Singh, V. K. Gupta, B. D. Gupta, R. K. Johri, *Journal of medicinal food* **2009**, 12, 374; g) C. J. Cavallito, J. H. Bailey, *Journal of the American Chemical Society* **1944**, 66, 1950; h) N. Benkeblia, *LWT-Food Science and Technology* **2004**, 37, 263; i) K. T. Augusti, *Indian journal of experimental biology* **1996**, 34, 634.
- [3] N. Friesen, *Osnabrücker Naturwissenschaftliche Mitteilungen* **2008**, 33, 95.
- [4] F. Memariani, M. R. Joharchi, A. A. Arjmandi, *Phytotaxa* **2012**, 56, 28.
- [5] N. Friesen, R. M. Fritsch, F. R. Blattner, *Aliso* **2006**, 22, 372.
- [6] R. M. Fritsch, N. Friesen, *Allium Crop Science: Recent Advances*. CABI Publishing, Wallingford, UK **2002**, 5.
- [7] a) C. Brullo, S. Brullo, G. G. Del Galdo, C. Salmeri, *Phytotaxa* **2017**, 327, 237; b) H. YILDIRIM, *Phytotaxa* **2019**, 403, 39.
- [8] a) R. Ebrahimi, Hassandokht, Z. Zamani, I. Roldan-Ruiz, H. Muylle, S. van Glaebeke, E. van Bockstaele, A. Kashi, *Brazilian Journal of Botany* **2019**, 42, 83; b) R. M. Fritsch, M. Gurushidze, J. Jedelska, M. Keusgen, *Planta Med* **2007**, 73, 26.
- [9] R. M. Fritsch, F. R. Blattner, M. Gurushidze, *Phyton* **2010**, 49, 145.
- [10] N. Yoshimoto, A. Yabe, Y. Sugino, S. Murakami, N. Sai-ngam, S. Sumi, T. Tsuneyoshi, K. Saito, *Frontiers in plant science* **2015**, 5, 758.
- [11] L. D. Lawson, Z.-Y. J. Wang, B. G. Hughes, *Journal of natural products* **1991**, 54, 436.
- [12] E. B. Kuettner, R. Hilgenfeld, M. S. Weiss, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2002**, 402, 192.
- [13] A. Stoll, E. Seebeck, *Helvetica Chimica Acta* **1951**, 34, 481.

-
- [14] a) B. Bai, F. Chen, Z. Wang, X. Liao, G. Zhao, X. Hu, *Journal of agricultural and food chemistry* **2005**, 53, 7103; b) Y. Yamazaki, T. Yamamoto, T. Okuno, *Food Science and Technology Research* **2012**, 18, 187; c) S. Imai, K. Akita, M. Tomotake, H. Sawada, *Journal of agricultural and food chemistry* **2006**, 54, 843; d) Y. Dong, D. Wang, M. Li, X. Hu, G. Zhao, *Food chemistry* **2010**, 119, 548; e) E. J. Lee, Y. H. Rezenom, D. H. Russell, B. S. Patil, K. S. Yoo, *Food chemistry* **2012**, 131, 852.
- [15] E. Block, B. Dethier, B. Bechand, J. J. H. Cotelesage, G. N. George, K. Goto, I. J. Pickering, E. Mendoza Rengifo, R. Sheridan, E. Y. Sneed et al., *Journal of agricultural and food chemistry* **2018**, 66, 10193.
- [16] J. Jedelská, A. Vogt, U. M. Reinscheid, M. Keusgen, *Journal of agricultural and food chemistry* **2008**, 56, 1465.
- [17] P. KucEROVÁ, R. Kubec, P. Simek, L. Václavík, J. Schraml, *Journal of agricultural and food chemistry* **2011**, 59, 1821.
- [18] E. Rodriguez, M. Aregullin, T. Nishida, S. Uehara, R. Wrangham, Z. Abramowski, A. Finlayson, G. H. Towers, *Experientia* **1985**, 41, 419.
- [19] H. L. Williams, C. F. Chabalowski, *The Journal of Physical Chemistry A* **2001**, 105, 646.
- [20] W. Schroth, E. Hintzsche, M. Felicetti, R. Spitzner, J. Sieler, R. Kempe, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 808.
- [21] W. Schroth, E. Hintzsche, H. Jordan, T. Jende, R. Spitzner, I. Thondorf, *Tetrahedron* **1997**, 53, 7509.
- [22] Y. Le Gal, D. Ameline, A. Vacher, T. Roisnel, V. Dorcet, D. Lorcy, *New Journal of Chemistry* **2016**, 40, 9930.
- [23] R. F. Khairutdinov, N. Serpone, *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, 103, 761.
- [24] W. Küster, *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* **1912**, 82, 463.
- [25] a) J. T. Groves, P. Viski, *Journal of the American Chemical Society* **1989**, 111, 8537; b) J. T. Groves, R. Quinn, *Journal of the American Chemical Society* **1985**, 107, 5790; c) S. Mang, A. I. Cooper, M. E. Colclough, N. Chauhan, A. B. Holmes, *Macromolecules* **2000**, 33, 303.
- [26] M. Biesaga, K. Pyrzyńska, M. Trojanowicz, *Talanta* **2000**, 51, 209.
- [27] A. Treibs, *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1969**, 728, 115.
- [28] L.-L. Li, E. W.-G. Diao, *Chemical Society Reviews* **2013**, 42, 291.

-
- [29] a) M. J. Crossley, P. Thordarson, J. P. Bannerman, P. J. Maynard, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **1998**, 2, 511; b) P. Rothmund, *Journal of the American Chemical Society* **1936**, 58, 625.
- [30] A. D. Adler, F. R. Longo, W. Shergalis, *Journal of the American Chemical Society* **1964**, 86, 3145.
- [31] A. D. Adler, L. Sklar, F. R. Longo, J. D. Finarelli, M. G. Finarelli, *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1968**, 5, 669.
- [32] a) d. R. Am Gonsalves, J. M. Varejão, M. M. Pereira, *Journal of Heterocyclic Chemistry* **1991**, 28, 635; b) H. A. Ali, V. M. Dembitsky, M. Srebnik (Hrsg.) *Studies in Inorganic Chemistry*, Elsevier, **2005**; c) T. D. Lash, T. G. Marron, J. A. Bastian, *Tetrahedron* **2007**, 63, 12343; d) J. L. Sessler, D. Seidel, *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, 42, 5134; e) D. P. Arnold, L. J. Nitschinsk, *Tetrahedron letters* **1993**, 34, 693.
- [33] K. Kadish, R. Guillard, K. M. Smith, *The Porphyrin Handbook. Phthalocyanines: Spectroscopic and Electrochemical Characterization*, Elsevier Science, Burlington, **2006**.
- [34] a) A. C. Hauer, *Monatsschrift Kinderheilkunde* **2017**, 165, 907; b) C. Borelli, K. Merk, G. Plewig, K. Degitz, *Der Hautarzt* **2005**, 56, 1027; c) D. E. Dolmans, D. Fukumura, R. K. Jain, *Nature reviews cancer* **2003**, 3, 380; d) R.-M. Szeimies, M. Landthaler, *Der Hautarzt* **1995**, 46, 315; e) T. Maisch, R.-M. Szeimies, N. Lehn, C. Abels, *Der Hautarzt* **2005**, 56, 1048.
- [35] a) A. Fürstner, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 3706; b) C. C. Hughes, C. A. Kauffman, P. R. Jensen, W. Fenical, *The Journal of Organic Chemistry* **2010**, 75, 3240; c) S. Omura, Y. Sasaki, Y. Iwai, H. TAKESHIMA, *The Journal of antibiotics* **1995**, 48, 535; d) C. Peschko, C. Winklhofer, A. Terpin, W. Steglich, *Synthesis* **2006**, 2006, 3048; e) J. A. Edgar*, C. C. Culvenor, G. S. Robinson, *Australian Journal of Entomology* **1973**, 12, 144.
- [36] a) V. Amarnath, D. C. Anthony, K. Amarnath, W. M. Valentine, L. A. Wetterau, D. G. Graham, *The Journal of Organic Chemistry* **1991**, 56, 6924; b) B. K. Banik, I. Banik, M. Renteria, S. K. Dasgupta, *Tetrahedron letters* **2005**, 46, 2643; c) D. H. R. Barton, S. Z. Zard, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1985**, 1098; d) V. Estevez, M. Villacampa, J. C. Menendez, *Chemical Society Reviews* **2010**, 39, 4402; e) B. C. Milgram, K. Eskildsen, S. M. Richter, W. R.

- Scheidt, K. A. Scheidt, *The Journal of Organic Chemistry* **2007**, 72, 3941; f) M. W. Roomi, S. F. MacDonald, *Can. J. Chem.* **1970**, 48, 1689.
- [37] B. L. Bray, P. H. Mathies, R. Naef, D. R. Solas, T. T. Tidwell, D. R. Artis, J. M. Muchowski, *The Journal of Organic Chemistry* **1990**, 55, 6317.
- [38] A. A. Kanakis, V. Sarli, *Organic letters* **2010**, 12, 4872.
- [39] R. Li, *Med. Res. Rev.* **2016**, 36, 169.
- [40] F. Matsumura, *Toxicology of insecticides*, Springer Science & Business Media, **2012**.
- [41] a) H. Abe, S. Aoyagi, C. Kibayashi, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, 1473; b) P. Schär, S. Cren, P. Renaud, *CHIMIA International Journal for Chemistry* **2006**, 60, 131.
- [42] T. Castanheiro, J. Suffert, M. Donnard, M. Gulea, *Chemical Society Reviews* **2016**, 45, 494.
- [43] J. S. Yadav, B. V. Reddy, S. Shubashree, K. Sadashiv, *Tetrahedron letters* **2004**, 45, 2951.
- [44] G. Wu, Q. Liu, Y. Shen, W. Wu, L. Wu, *Tetrahedron letters* **2005**, 46, 5831.
- [45] V. Nair, L. G. Nair, *Tetrahedron letters* **1998**, 39, 4585.
- [46] a) Y. Chen, H. Qi, N. Chen, D. Ren, J. Xu, Z. Yang, *The Journal of Organic Chemistry* **2019**; b) N. Iranpoor, H. Firouzabadi, H. R. Shaterian, *Tetrahedron letters* **2002**, 43, 3439; c) W. Guo, W. Tan, M. Zhao, L. Zheng, K. Tao, D. Chen, X. Fan, *The Journal of Organic Chemistry* **2018**, 83, 6580.
- [47] L. Cao, S.-H. Luo, K. Jiang, Z.-F. Hao, B.-W. Wang, C.-M. Pang, Z.-Y. Wang, *Organic letters* **2018**, 20, 4754.
- [48] S. Vorona, T. Artamonova, Y. Zevatskii, L. Myznikov, *Synthesis* **2014**, 46, 781.
- [49] a) S. Patai, *The chemistry of cyanates and their thio derivatives. Part 2*, Wiley, Chichester, **1977**; b) F. Wilcoxon, A. Hartzell, *Journal of Economic Entomology* **1935**, 28, 153.
- [50] R. Riemschneider, *Journal of the American Chemical Society* **1956**, 78, 844.
- [51] A. Stoll, E. Seebeck, *Helvetica Chimica Acta* **1948**, 31, 189.
- [52] M. Keusgen, *Biosensorische Methoden zur quantitativen Bestimmung von Cysteinsulfoxiden*, Shaker, **1999**.
- [53] I. Koch, M. Keusgen, *Pharmazie* **1998**, 53, 668.
- [54] a) H. Fu, H. Kondo, Y. Ichikawa, G. C. Look, C. H. Wong, *The Journal of Organic Chemistry* **1992**, 57, 7265; b) G. Ottolina, P. Pasta, G. Carrea, S. Colonna,

- S. Dallavalle, H. L. Holland, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, 6, 1375; c) G. Carrea, B. Redigolo, S. Riva, S. Colonna, N. Gaggero, E. Battistel, D. Bianchi, *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, 3, 1063; d) G. E. O'Mahony, A. Ford, A. R. Maguire, *Journal of Sulfur Chemistry* **2013**, 34, 301.
- [55] F. Silva, A. Baker, J. Stansall, W. Michalska, M. S. Yusubov, M. Graz, R. Saunders, G. J. S. Evans, T. Wirth, *European Journal of Organic Chemistry* **2018**, 2018, 2134.
- [56] S. Choi, J.-D. Yang, M. Ji, H. Choi, M. Kee, K.-H. Ahn, S.-H. Byeon, W. Baik, S. Koo, *The Journal of Organic Chemistry* **2001**, 66, 8192.
- [57] a) G. Egidi, *Zeitschrift für Evidenz, Fortbildung und Qualität im Gesundheitswesen* **2008**, 102, 285; b) M. Feng, B. Tang, S. H. Liang, X. Jiang, *Current topics in medicinal chemistry* **2016**, 16, 1200.
- [58] a) J. Hughes, A. Tregova, A. B. Tomsett, M. G. Jones, R. Cosstick, H. A. Collin, *Phytochemistry* **2005**, 66, 187; b) E. Block, T. Bayer, S. Naganathan, S.-H. Zhao, *Journal of the American Chemical Society* **1996**, 118, 2799; c) E. Block, M. Birringer, W. Jiang, T. Nakahodo, H. J. Thompson, P. J. Toscano, H. Uzar, X. Zhang, Z. Zhu, *Journal of agricultural and food chemistry* **2001**, 49, 458; d) E. Block, H. Gulati, D. Putman, D. Sha, N. You, S.-H. Zhao, *Journal of agricultural and food chemistry* **1997**, 45, 4414; e) E. Block, M. Thiruvazhi, P. J. Toscano, T. Bayer, S. Grisoni, S.-H. Zhao, *Journal of the American Chemical Society* **1996**, 118, 2790; f) E. Block, S. H. Zhao, *The Journal of Organic Chemistry* **1992**, 57, 5815.
- [59] M. Farnier, S. Soth, P. Fournari, *Can. J. Chem.* **1976**, 54, 1083.
- [60] M. Farnier, S. Soth, P. Fournari, *Can. J. Chem.* **1976**, 54, 1074.
- [61] T. Dohi, K. Morimoto, M. Ito, Y. Kita, *Synthesis* **2007**, 2007, 2913.
- [62] S. Cossu, G. Delogu, O. D. Lucchi, D. Fabbri, M. P. Foies, *Synthetic communications* **1989**, 19, 3431.
- [63] P. KucEROVÁ, R. Kubec, P. Simek, L. Václavík, J. Schraml, *Journal of agricultural and food chemistry* **2011**, 59, 1821.
- [64] K. Reddy, G. Krishna Mohan, S. Satla, S. Gaikwad, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2011**, 6.
- [65] T. Heinze, T. Liebert, B. Heublein, S. Hornig in *Polysaccharides II*, Springer, **2006**, S. 199–291.
- [66] R. S. Singh, G. K. Saini, J. F. Kennedy, *Carbohydrate polymers* **2008**, 73, 515.

-
- [67] D. Le Corre, J. Bras, A. Dufresne, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1139.
- [68] A. D. Augst, H. J. Kong, D. J. Mooney, *Macromolecular bioscience* **2006**, *6*, 623.
- [69] B. Weissmann, K. Meyer, *Journal of the American Chemical Society* **1954**, *76*, 1753.
- [70] M. Rinaudo, *Progress in polymer science* **2006**, *31*, 603.
- [71] M. A. Meyers, P.-Y. Chen, A. Y.-M. Lin, Y. Seki, *Progress in Materials Science* **2008**, *53*, 1.
- [72] A. Zong, H. Cao, F. Wang, *Carbohydrate polymers* **2012**, *90*, 1395.
- [73] H. Wang, Y. M. Liu, Z. M. Qi, S. Y. Wang, S. X. Liu, X. Li, H. J. Wang, X. C. Xia, *Current medicinal chemistry* **2013**, *20*, 2899.
- [74] A. T. Paulino, L. A. Belfiore, L. T. Kubota, E. C. Muniz, E. B. Tambourgi, *Chemical Engineering Journal* **2011**, *168*, 68.
- [75] a) T. D. Leathers, *Applied microbiology and biotechnology* **2003**, *62*, 468; b) V. D. Prajapati, G. K. Jani, S. M. Khanda, *Carbohydrate polymers* **2013**, *95*, 540; c) S. Yuen, *Process Biochemistry* **1974**.
- [76] B. Watzl, S. Girrbach, M. Roller, *British journal of Nutrition* **2005**, *93*, S49-S55.
- [77] C. V. Stevens, A. Meriggi, K. Booten, *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 1.
- [78] a) A. Franck, *British journal of Nutrition* **2002**, *87*, S287-S291; b) M. Roberfroid, *Inulin-type fructans: functional food ingredients*, CRC Press, **2004**; c) M. Shoaib, A. Shehzad, M. Omar, A. Rakha, H. Raza, H. R. Sharif, A. Shakeel, A. Ansari, S. Niazi, *Carbohydrate polymers* **2016**, *147*, 444.
- [79] G. S. Kelly, *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic* **1999**, *4*, 96.
- [80] a) A. Majewska-Sawka, E. A. Nothnagel, *Plant Physiology* **2000**, *122*, 3; b) E.-M. Choi, A.-J. Kim, Y.-O. Kim, J.-K. Hwang, *Journal of medicinal food* **2005**, *8*, 446.
- [81] S. Lofas, *Pure and applied chemistry* **1995**, *67*, 829.
- [82] a) S. S. Dhaneshwar, K. Mini, N. Gairola, S. S. Kadam, *Indian journal of pharmaceutical sciences* **2006**, *68*, 705; b) R. D. Hamstra, M. H. Block, A. L. Schocket, *Jama* **1980**, *243*, 1726.
- [83] a) J. C. Walsh, G. C. Kramer, *Circulatory shock* **1991**, *34*, 336; b) J. Varshosaz, *Expert Opinion on Drug Delivery* **2012**, *9*, 509; c) H. S. Cooper, S. N. Murthy, R. S. Shah, D. J. Sedergran, *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **1993**, *69*, 238.

-
- [84] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch, *Practical HPLC method development*, John Wiley & Sons, **2012**.
- [85] a) R. Gheshlaghi, J. M. Scharer, M. Moo-Young, P. L. Douglas, *Analytical biochemistry* **2008**, 383, 93; b) M. P. Bartolomeo, F. Maisano, *Journal of biomolecular techniques: JBT* **2006**, 17, 131.
- [86] a) L. Bosch, A. Alegría, R. Farré, *Journal of Chromatography B* **2006**, 831, 176; b) R. Gatti, M. G. Gioia, P. Andreatta, G. Pentassuglia, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **2004**, 35, 339; c) N. Li, Y. Liu, Y. Zhao, X. Zheng, J. Lu, Y. Liang, *Food analytical methods* **2016**, 9, 1307; d) E. de Mey, G. Drabik-Markiewicz, H. de Maere, M.-C. Peeters, G. Derdelinckx, H. Paelinck, T. Kowalska, *Food chemistry* **2012**, 130, 1017.
- [87] H. Tanaka, X. Zhou, O. Masayoshi, *Journal of Chromatography A* **2003**, 987, 119.
- [88] R. B. M. Schasfoort, *Handbook of surface plasmon resonance*, Royal Society of Chemistry, **2017**.
- [89] J. Homola, M. Piliarik in *Surface plasmon resonance based sensors*, Springer, **2006**, S. 45–67.
- [90] B. Liedberg, C. Nylander, I. Lunström, *Sensors and actuators* **1983**, 4, 299.
- [91] L. Zhou, V. Todorovic, S. Kakavas, B. Sielaff, L. Medina, L. Wang, R. Sathukhan, H. Stockmann, P. L. Richardson, E. DiGiammarino, *Journal of Biological Chemistry* **2018**, 293, 403.
- [92] S. Wang, Y. Dong, X. Liang, *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, 109, 1.
- [93] a) M. Puiu, C. Bala, *Sensors* **2016**, 16, 870; b) J.-F. Masson, *ACS sensors* **2017**, 2, 16.
- [94] a) S. Kumbhat, K. Sharma, R. Gehlot, A. Solanki, V. Joshi, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* **2010**, 52, 255; b) P. Jahanshahi, Q. Wei, Z. Jie, M. Ghomeishi, S. D. Sekaran, F. R. Mahamd Adikan, *Bioengineered* **2017**, 8, 239.
- [95] N. Ghosh, N. Gupta, G. Gupta, M. Boopathi, V. Pal, A. K. Goel, *Diagnostic microbiology and infectious disease* **2013**, 77, 14.
- [96] F. Zhang, S. Wang, L. Yin, Y. Yang, Y. Guan, W. Wang, H. Xu, N. Tao, *Analytical Chemistry* **2015**, 87, 9960.
- [97] M. Piliarik, M. Bocková, J. Homola, *Biosensors & bioelectronics* **2010**, 26, 1656.

-
- [98] N. Xia, L. Liu, M. G. Harrington, J. Wang, F. Zhou, *Analytical Chemistry* **2010**, 82, 10151.
- [99] J. Guisán, *Enzyme and Microbial Technology* **1988**, 10, 375.
- [100] N. Dassinger **2015**.
- [101] S. H. Brewer, W. R. Glomm, M. C. Johnson, M. K. Knag, S. Franzen, *Langmuir* **2005**, 21, 9303.
- [102] a) T. H. L. Nghiem, T. H. La, X. H. Vu, V. H. Chu, T. H. Nguyen, Q. H. Le, E. Fort, Q. H. Do, H. N. Tran, *Advances in Natural Sciences: nanoscience and nanotechnology* **2010**, 1, 25009; b) N. Wangoo, C. R. Suri, G. Shekhawat, *Applied Physics Letters* **2008**, 92, 133104.
- [103] a) P. Baptista, E. Pereira, P. Eaton, G. Doria, A. Miranda, I. Gomes, P. Quaresma, R. Franco, *Analytical and bioanalytical chemistry* **2008**, 391, 943; b) Y. Li, H. J. Schluesener, S. Xu, *Gold Bulletin* **2010**, 43, 29; c) J. Matsui, K. Akamatsu, N. Hara, D. Miyoshi, H. Nawafune, K. Tamaki, N. Sugimoto, *Analytical Chemistry* **2005**, 77, 4282.
- [104] a) Lacerda, Silvia H De Paoli, J. J. Park, C. Meuse, D. Pristinski, M. L. Becker, A. Karim, J. F. Douglas, *ACS nano* **2009**, 4, 365; b) P. Wang, X. Wang, L. Wang, X. Hou, W. Liu, C. Chen, *Science and technology of advanced materials* **2015**, 16, 34610.
- [105] H. Larsericsdotter, S. Oscarsson, J. Buijs, *Journal of colloid and interface science* **2005**, 289, 26.
- [106] G. Sakai, S. Nakata, T. Uda, N. Miura, N. Yamazoe, *Electrochimica Acta* **1999**, 44, 3849.
- [107] E. Mauriz, A. Calle, J. J. Manclus, A. Montoya, L. M. Lechuga, *Analytical and bioanalytical chemistry* **2007**, 387, 1449.
- [108] J. Kusterer **2010**.
- [109] A. F. Diaz, K. K. Kanazawa, G. P. Gardini, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1979**, 635.
- [110] C. Retich, S. Bräse, *European Journal of Organic Chemistry* **2018**, 2018, 60.
- [111] J. E. Taylor, M. D. Jones, J. M. J. Williams, S. D. Bull, *Organic letters* **2010**, 12, 5740.
- [112] E. A. John, P. Pollet, L. Gelbaum, J. Kubanek, *Journal of natural products* **2004**, 67, 1929.

-
- [113] B. A. Trofimov, A. I. Mikhaleva, A. N. Vasil'ev, S. E. Korostova, S. G. Shevchenko, *Chem Heterocycl Compd* **1985**, 21, 46.
- [114] M. Korb, U. Pfaff, A. Hildebrandt, T. Rüffer, H. Lang, *European Journal of Inorganic Chemistry* **2014**, 2014, 1051.
- [115] M. S. Grant, H. R. Snyder, *Journal of the American Chemical Society* **1960**, 82, 2742.
- [116] Bruna L. Kuhn, Margiani P. Fortes, Teodoro S. Kaufman, Claudio C. Silveira, *Tetrahedron letters* **2014**, 55, 1648.
- [117] M. P. Fortes, M. M. Bassaco, T. S. Kaufman, C. C. Silveira, *RSC Adv* **2014**, 4, 34519.
- [118] F. D. Toste, V. de Stefano, I. W. J. Still, *Synthetic communications* **1995**, 25, 1277.
- [119] N. Jain, A. Kumar, S. M. S. Chauhan, *Tetrahedron letters* **2005**, 46, 2599.
- [120] J.-L. Guo, B.-Z. Li, W.-M. Chen, P.-H. Sun, Y. Wang, *Letters in Drug Design & Discovery* **2009**, 6, 107.
- [121] M. Kawatsura, Y. Komatsu, M. Yamamoto, S. Hayase, T. Itoh, *Tetrahedron letters* **2007**, 48, 6480.
- [122] B. Zeynizadeh, *Journal of Chemical Research* **2002**, 2002, 564.
- [123] A. A. Zagulyaeva, M. S. Yusubov, V. V. Zhdankin, *The Journal of Organic Chemistry* **2010**, 75, 2119.
- [124] B. Massoumi, M. Jaymand, R. Samadi, A. A. Entezami, *J Polym Res* **2014**, 21.
- [125] A. Carpita, R. Rossi **1985**.
- [126] Y. Li, W.-H. Wang, S.-D. Yang, B.-J. Li, C. Feng, Z.-J. Shi, *Chemical Communications* **2010**, 46, 4553.
- [127] L. G. Reuter, A. G. Bonn, A. C. Stückl, B. He, P. B. Pati, S. S. Zade, O. S. Wenger, *The Journal of Physical Chemistry A* **2012**, 116, 7345.
- [128] W. Carpenter, M. S. Grant, H. R. Snyder, *Journal of the American Chemical Society* **1960**, 82, 2739.
- [129] M. Sattar, K. Patidar, R. A. Thorat, S. Kumar, *The Journal of Organic Chemistry* **2019**.
- [130] M. L. Czyz, G. K. Weragoda, R. Monaghan, T. U. Connell, M. Brzozowski, A. D. Scully, J. Burton, D. W. Lupton, A. Polyzos, *Organic & biomolecular chemistry* **2018**, 16, 1543.

-
- [131] J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier, *Discussions of the Faraday Society* **1951**, *11*, 55.
- [132] S. K. Sivaraman, S. Kumar, V. Santhanam, *Journal of colloid and interface science* **2011**, *361*, 543.
- [133] W. Haiss, N. T. K. Thanh, J. Aveyard, D. G. Fernig, *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 4215.
- [134] A. R. Hajipour, R. Pourkaveh, H. Karimi, *Applied Organometallic Chemistry* **2014**, *28*, 879.
- [135] O. Carmona, R. Greenhouse, R. Landeros, J. M. Muchowski, *The Journal of Organic Chemistry* **1980**, *45*, 5336.
- [136] F. Rüger, J. Schäfer, U. Bakowski, M. Keusgen, D. Vornicescu, *physica status solidi (a)* **2018**, *215*, 1800030.
- [137] N. Dassinger, D. Vornicescu, S. Merkl, M. Kehrel, E. Dayyoub, U. Bakowsky, M. Keusgen, *physica status solidi (a)* **2012**, *209*, 832.
- [138] S. Löfås, B. Johnsson, K. Tegendal, I. Rönnberg, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1993**, *1*, 83.
- [139] J. W. Donovan, T. M. White, *Biochemistry* **1971**, *10*, 32.
- [140] R. K. Olsen, H. R. Snyder, *The Journal of Organic Chemistry* **1965**, *30*, 187.
- [141] W. W. Wilkerson, W. Galbraith, K. Gans-Brangs, M. Grubb, W. E. Hewes, B. Jaffee, J. P. Kenney, J. Kerr, N. Wong, *Journal of medicinal chemistry* **1994**, *37*, 988.
- [142] J. P. Danehy, W. E. Hunter, *The Journal of Organic Chemistry* **1967**, *32*, 2047.
- [143] Z. V. Todres, N. G. Furmanova, S. P. Avagyan, Y. T. Struchkov, D. N. Kursanov, *Phosphorus and Sulfur and the Related Elements* **1979**, *5*, 309.

9 Anhang

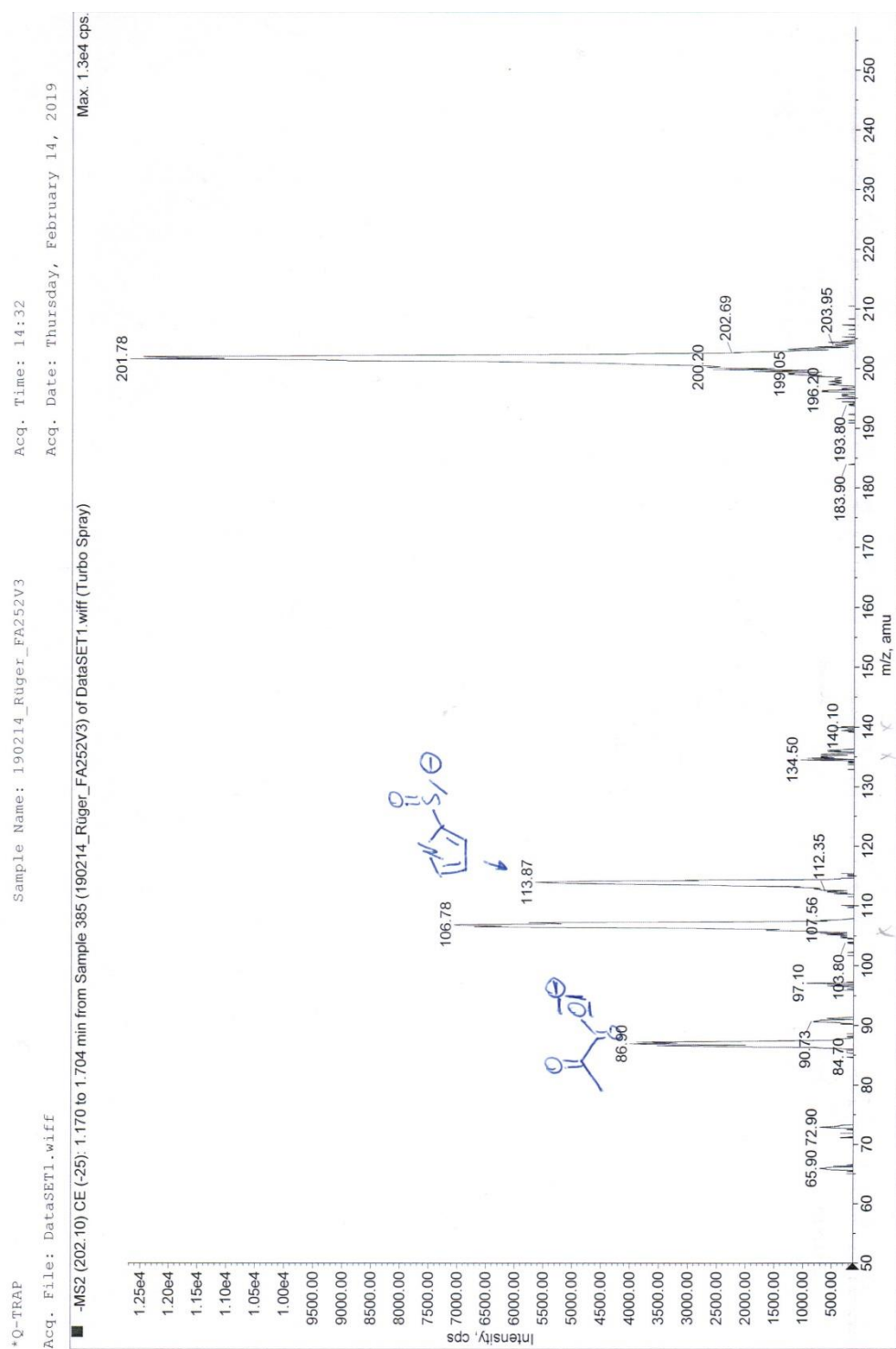
9.1 MS-, MSMS- und HRMS-Spektren

9.2 IR-Spektren

9.3 Kristallographische Daten

9.1 MS-, MSMS- und HRMS-Spektren

MSMS- Spektrum von m/z 202,1 (Pyrrol-2-lactylsulfoxid):



HRMS von synth. rotem Farbstoff:

Mass Spectrum SmartFormula Report

Analysis Info

Analysis Name \\dfs\pharmazie\home\zitzer\Dokumente\HRMS\20180926\Rueger\FA282_27_01_9482.d
Method Versuch neue Kalibrierung 50-850 neg.m
Sample Name FA282
Comment *Q7 synth.*

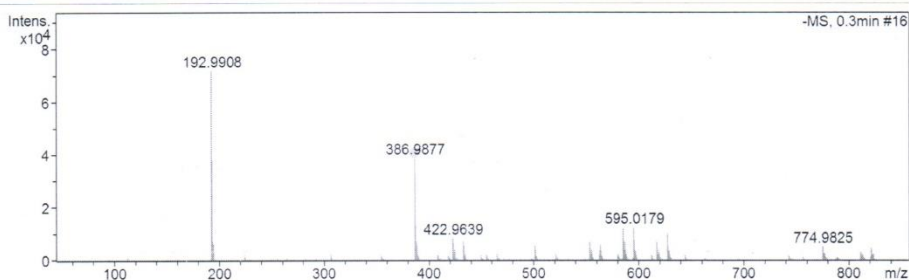
Acquisition Date 26.09.2018 11:07:30

Operator AkLi

Instrument micrOTOF-Q III 8228888.20513

Acquisition Parameter

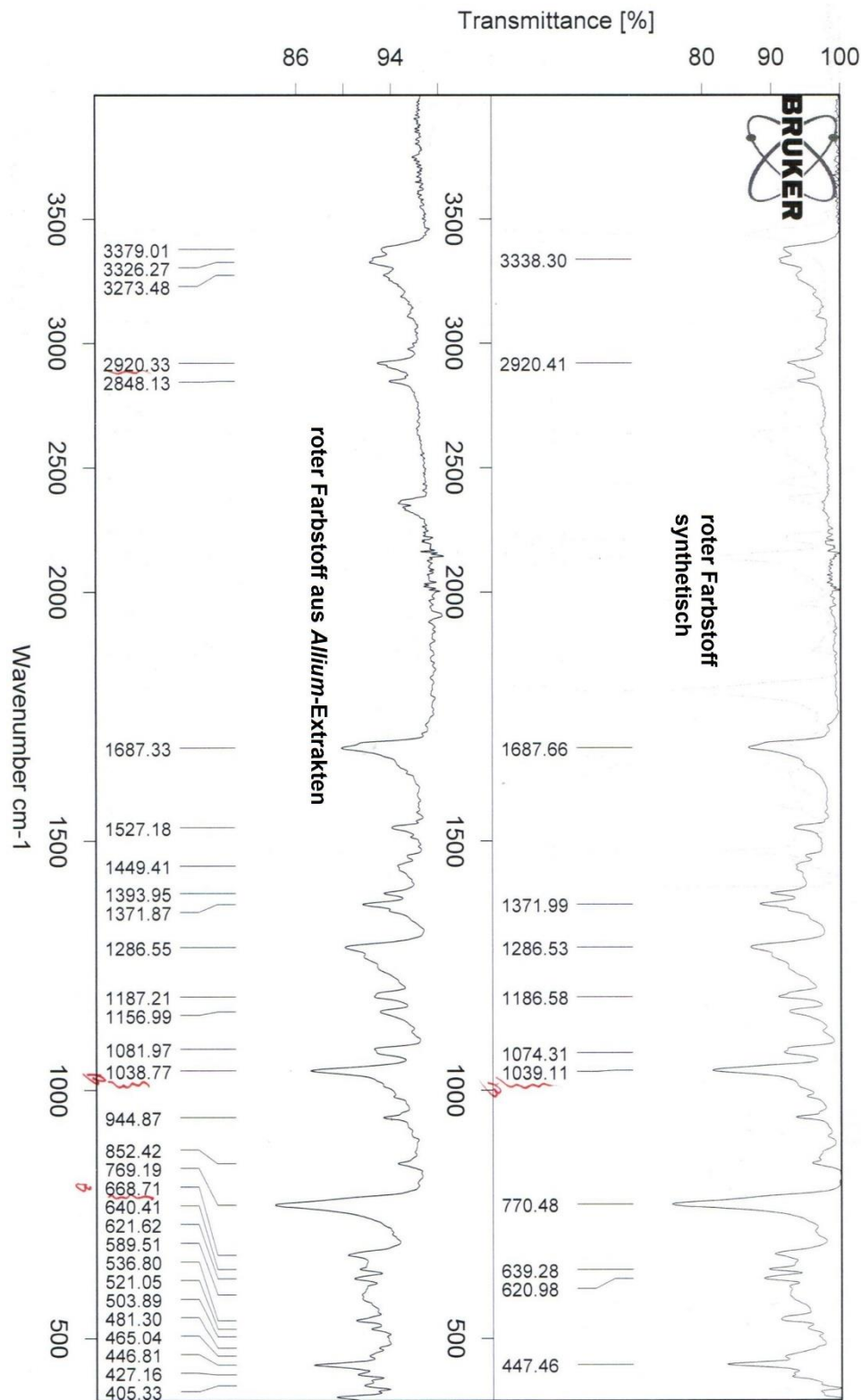
Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	2.5 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	2800 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	50 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	6.0 l/min
Scan End	850 m/z	Set Collision Cell RF	120.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste



Meas. m/z	#	Ion Formula	m/z	err [ppm]	mSigma	# mSigma	Score	rdb	e ⁻	Conf	N-Rule
386.9877	1	C16H11N4S4	386.9872	-1.4	13.2	1	100.00	13.5	even		ok
	2	C19H7N4S3	386.9838	-10.1	14.4	2	6.32	18.5	even		ok
	3	C15H15O4S4	386.9859	-4.8	16.3	3	41.62	8.5	even		ok
	4	C20H7N2O3S2	386.9904	6.8	28.8	4	13.60	18.5	even		ok
	5	C15H7N4O5S2	386.9863	-3.6	30.6	5	33.42	14.5	even		ok
	6	C14H11O9S2	386.9850	-7.1	34.8	6	10.66	9.5	even		ok
	7	C23H3N2O3S	386.9870	-1.9	51.9	7	27.04	23.5	even		ok
	8	C28H3OS	386.9910	8.5	63.1	8	2.67	27.5	even		ok

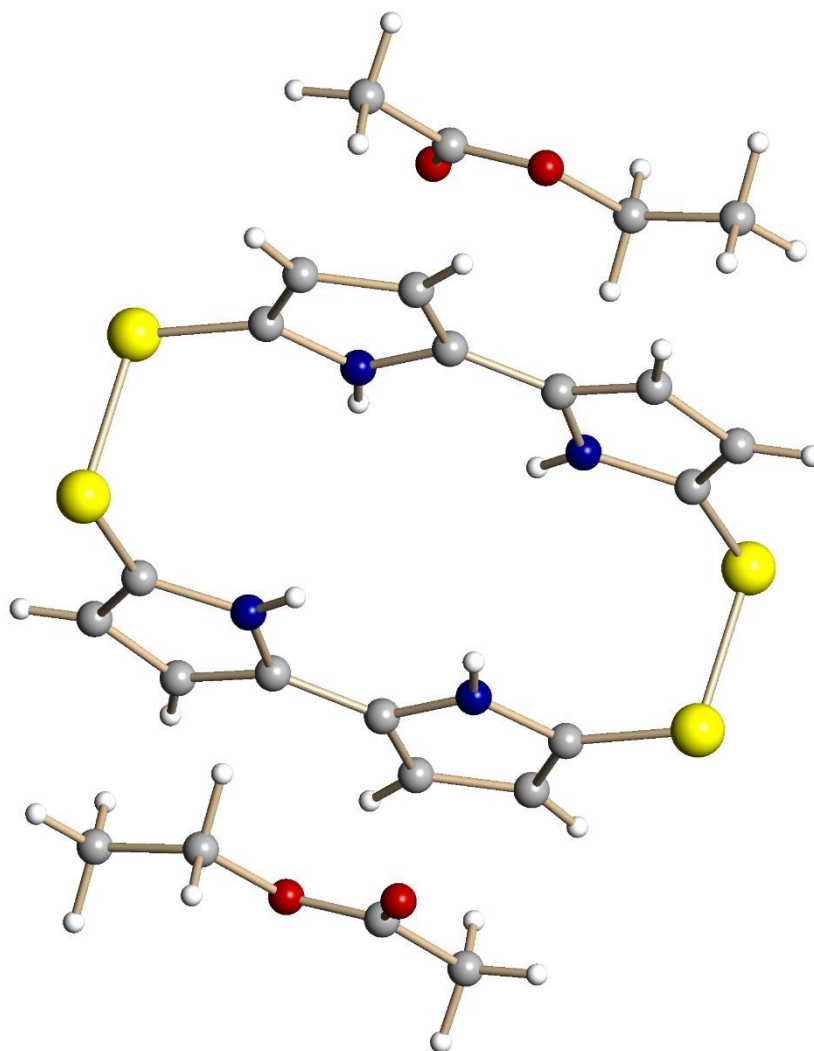
9.2 IR-Spektren

Vergleichendes FTIR-Spektrum von nat. und synth RF:

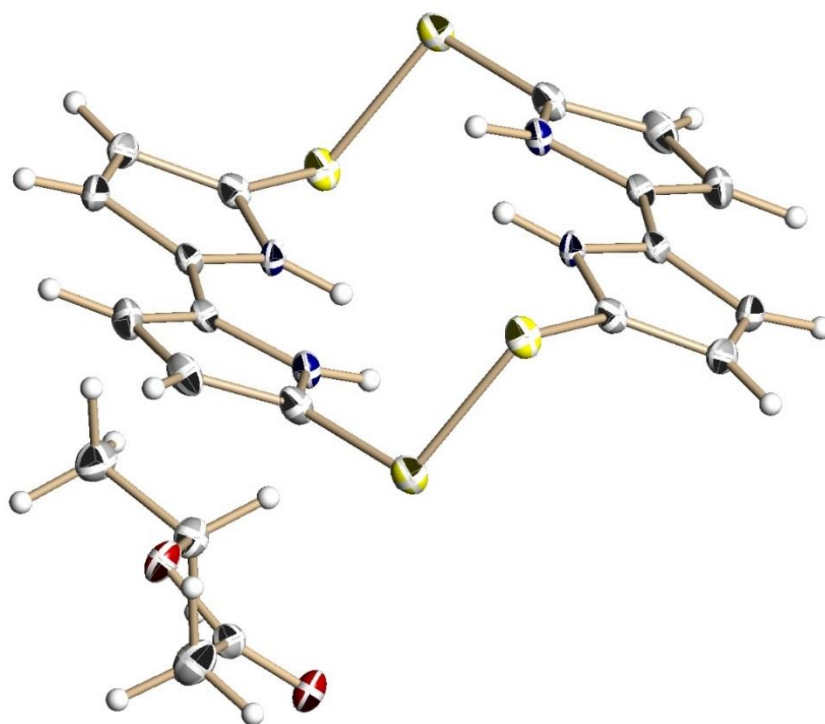


9.3 Kristallographische Daten

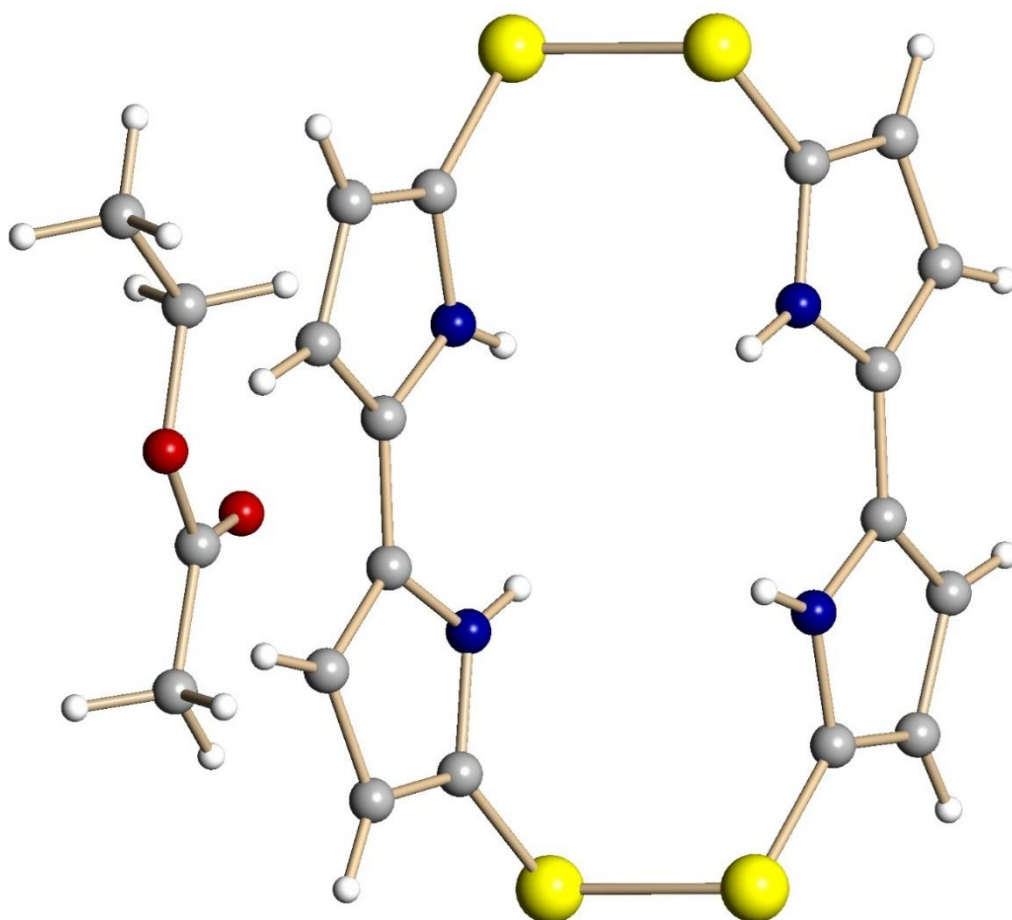
Ausgewertet von Prof. Dr. A. Heine (Pharmazeutische Chemie Universität Marburg):



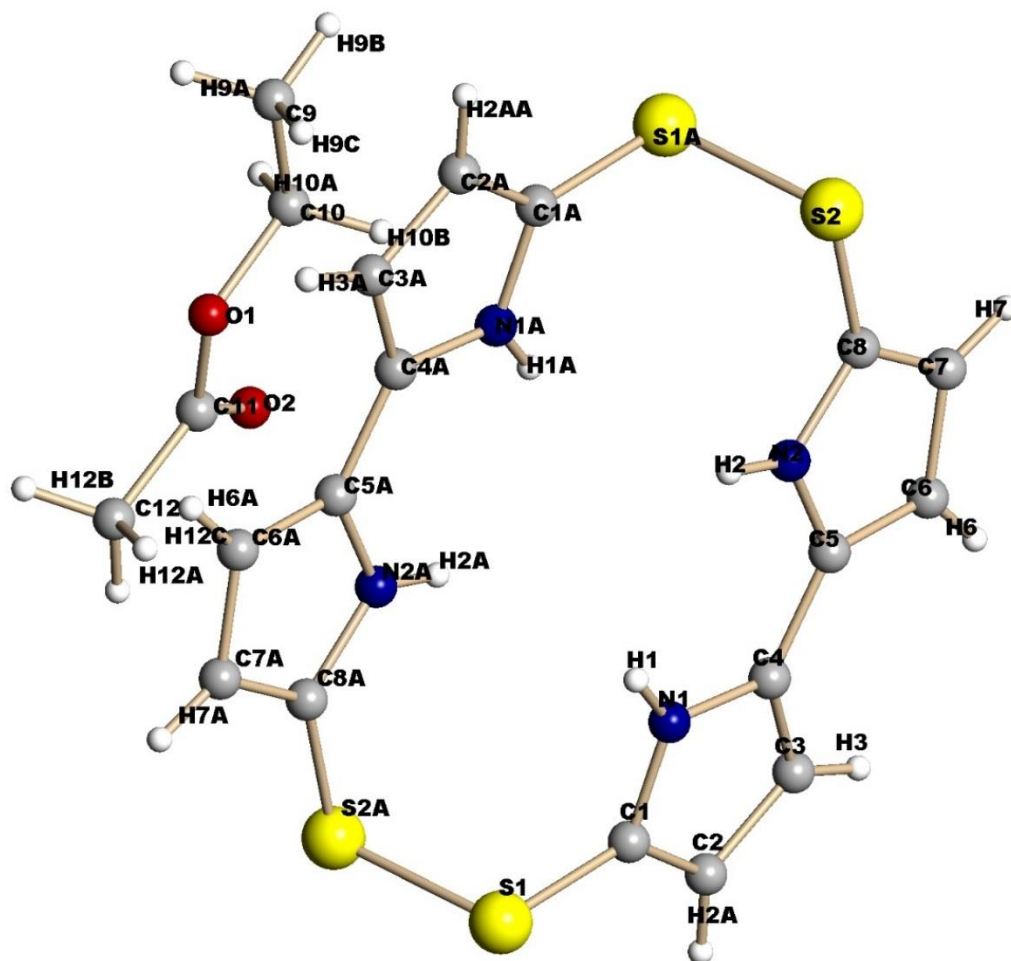
Einheitszelle von K7Nfinal (roter Farbstoff)



Alternative Darstellung von K7Nfinal.



Veränderter Blickwinkel auf die Konformation von K7Nfinal.



Top down Ansicht von K7Nfinal

Die weiteren Strukturdaten wurden online (Cambridge Crystallographic Data Centre) hinterlegt (<https://www.ccdc.cam.ac.uk>).

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Promotionsarbeit:

Analytik und Synthese von Pyrrol-Schwefelverbindungen der Gattung *Allium* sowie deren Verwendung in der Biosensorik

selbstständig ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Alle, den benutzten Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen, sind als solche einzeln kenntlich gemacht.

Diese Dissertation ist in der vorliegenden oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht worden.

Ich bin mir bewusst, dass eine falsche Erklärung rechtliche Folgen haben wird.

Maburg, (upload 13.04.2021)

Fabian Alexander Rüger